

Université de Sherbrooke

**Chémoréflexes laryngés en période néonatale :
influence de la prématurité et d'une exposition
post-natale à la fumée secondaire**

par

Marie St-Hilaire

Département de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences
de la santé en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D) en physiologie

12 mars 2010

Évaluateurs

Dr. Jean-Paul Praud, programme de physiologie

Dr. Louis Gendron, programme de physiologie

Dr. Pierre Larivée, programme d'immunologie

Dre. Aida Bairam, département de pédiatrie, Université Laval



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-62836-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-62836-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Résumé	8
Introduction	10
★ Anatomie du larynx	12
1.1 Innervation du larynx	14
1.2 Histologie du larynx	17
1.3 Récepteurs du larynx	17
★ Chémoréflexes laryngés	20
2. Chémoréflexes laryngés... de la théorie à la clinique	22
2.1 Implication clinique	22
• Apnée du prématuré	22
• Malaises graves du nourrisson	25
• Syndrome de mort subite du nourrisson	26
2.2 Liquides et chémoréflexes laryngés	32
• Sécrétions des voies aériennes supérieures	32
• Lait	33
• Reflux laryngo-pharyngés	34
3. Chémoréflexes laryngés... de la clinique à la physiologie	35
3.1 Origine potentielle des chémoréflexes laryngés chez le nouveau-né	35
3.2 Chémoréflexes laryngés en période néonatale	36
3.3 Circuit neuronal impliqué dans les chémoréflexes laryngés	38
3.4 Maturation des chémoréflexes laryngés	39
3.5 Chémoréflexes laryngés chez les nouveau-nés à terme	40
3.6 Facteurs environnementaux et chémoréflexes laryngés	44
• Chémoréflexes laryngés et prématurité	45
• Chémoréflexes laryngés et exposition à la fumée secondaire	45

★ Objectif de mon projet de doctorat	46
Articles	48
★ Article 1	50
★ Article 2	91
Discussion	130
★ Influence de la prématurité	131
1.1 Modèle d'agneau prématuré	131
1.2 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré	132
1.3 Maturation post-natale des chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré	135
★ Influence d'une exposition à la fumée secondaire	137
2.1 Modèle d'exposition à la fumée secondaire	137
2.2 Exposition post-natale à la fumée secondaire sur les chémoréflexes laryngés	138
★ Stade de conscience	147
★ Salin vs Eau distillée vs Acide vs Lait	148
★ Implications cliniques	152
5.1 Influence de la prématurité	153
5.2 Influence d'une exposition à la fumée secondaire	154
★ Perspectives	159
Conclusion	160
Remerciements	161
Références	164

Liste des figures

Introduction

1 : Anatomie du larynx	12
2 : Anatomie du larynx; localisation des différentes régions du larynx	14
3 : Innervation sensitive et motrice du larynx	15
4 : Densité des afférences nerveuses au niveau du larynx	16
5 : Pathogénèse des apnées du prématuré	24
6 : Pathogénèse du syndrome de mort subite du nourrisson	28
7 : Durée de l'apnée	38
8 : Première étape du circuit neuronal des chémoréflexes laryngés	39
9 : Durée de l'apnée en fonction de l'âge post-natal	40
10 : Chémoréflexes laryngés en réponse à l'instillation d'acide citrique	43

Article 1

1 : Potentially life-threatening cardiorespiratory reflexes triggers in preterm lambs at post-natal day 7 and day 14	70
2: Effect of postnatal maturation on the percentage of decrease in respiratory rate, decrease in heart rate and apnea duration	72
3: Effect of caffeine treatment on the percentage in heart rate and apnea duration	75

Article 2

1 : Cardiorespiratory reflexes triggered in a lamb at post-natal day 15 after two weeks of exposure to cigarette smoke, following instillation of 0.5 ml hydrochloric acid onto laryngeal mucosa during quiet sleep.	112
--	-----

Discussion

11: Maturation de la respiration (volume pulmonaire chez les agneaux à terme et les agneaux prématurés	135
12 : Théorie du « Triple risque » du syndrome de mort subite du nourrisson	157
13 : Séquence des dernières secondes des victimes du SMSN	158

Liste des tableaux

Introduction

1 : Muscles intrinsèques du larynx	13
2 : Causes potentielles d'apnées du prématuré	22
3 : Causes potentielles de malaises graves du nourrisson	25
4 : Stades de conscience	42

Article 1

1: Laryngeal chemoreflexes developing in response to various stimuli in quiet sleep on post-natal days 7 and 14	68
2: Apnea and bradycardia duration for each stimulus on postnatal days 7 (D7) and 14 (D14) in quiet sleep	69
3: Laryngeal chemoreflexes developing in response to various stimuli for each state of alertness on post-natal day 7	74

Article 2

1: Baseline values for each group	107
2: Characteristics of laryngeal chemoreflexes following 16 day-exposure to cigarette smoke	109
3: Comparison of laryngeal chemoreflexes elicited by saline, distilled water, hydrochloric acid and milk	101
4: Comparison of laryngeal chemoreflexes elicited in quiet sleep and active sleep	114

Liste des abréviations

CPAP

Ventilation à pression positive

CRL

Chémoréflexes laryngés

MGN

Malaises graves du nourrisson

SMSN

Syndrome de mort subite du nourrisson

VAI

Voies aériennes inférieures

VAS

Voies aériennes supérieures

Chémoréflexes laryngés en période néonatale : influence de la prématurité et d'une exposition post-natale à la fumée secondaire
Marie St-Hilaire, Programme de physiologie, Université de Sherbrooke

Les reflux laryngo-pharyngés acides, très fréquents en période néonatale, sont la remontée du contenu gastrique jusqu'au niveau du pharynx. Le contact entre un liquide (ex : liquide gastrique acide) et le larynx déclenche chez un nouveau-né à terme et en santé des mécanismes de défense (toux, déglutition, réaction d'éveil) appelés chémoréflexes laryngés, dont l'objectif est d'empêcher l'aspiration dans la trachée. Malheureusement, chez certains nouveau-nés, le contact entre le liquide et la muqueuse laryngée déclenche des réflexes délétères comprenant des apnées, des bradycardies et désaturations. Ces réflexes délétères sont impliqués dans les apnées du prématuré, les malaises graves du nourrisson et probablement dans certains cas du syndrome de mort subite du nourrisson. Les observations cliniques suggèrent que certaines conditions néonatales, dont la prématurité et une exposition post-natale à la fumée secondaire, favorisent la survenue de ces réflexes délétères. Ainsi, mon projet de doctorat consiste à étudier l'influence de la prématurité et l'influence d'une exposition à la fumée secondaire sur les CRL chez l'agneau nouveau-né. L'influence de la prématurité a été effectuée en utilisant un modèle d'agneau prématuré à 132 jours de gestation (terme = 147 jours). L'influence d'une exposition à la fumée secondaire post-natale, a, quant à elle, été effectuée en utilisant un modèle d'agneau exposé à la fumée secondaire durant les 16 premiers jours de vie à raison de 20 cigarettes/jour. Dans chaque étude, les agneaux ont été instrumentés pour enregistrer l'activité du muscle constricteur du larynx (muscle thyroaryténoïdien), l'électroencéphalogramme, la fréquence cardiaque, la respiration et la saturation. Un cathéter supra-glottique a été utilisé pour l'injection de 0.5 ml de différentes solutions (modèle de prématuré : injection de sérum physiologique, d'eau distillée et HCl, pH 2; modèle d'exposition à la fumée secondaire : injection de sérum physiologique, d'eau distillée, HCl pH 2, lait) durant les différents stades de conscience. Le modèle d'agneau prématuré a permis de démontrer qu'une stimulation laryngée soit par l'eau distillée ou HCl à 7 jour post-natal induit des apnées prolongées, des bradycardies et des désaturations, lesquels sont potentiellement dangereuses. À l'inverse, une stimulation laryngée à 14 jours post-natals n'induit pas d'évènement cardiorespiratoire cliniquement significatif. Le modèle d'exposition à la fumée secondaire a, quant à lui, permis de démontrer qu'une exposition post-natale à la fumée secondaire induit une inhibition cardiorespiratoire plus importante et diminue les mécanismes de protection suite à une stimulation laryngée. Par contre, aucune stimulation n'entraîne d'évènement pouvant mettre en péril la vie de l'agneau. En conclusion, la survenue de réflexe potentiellement dangereux suite à une stimulation laryngée semble survenir en présence

de certaines conditions néonatales. La prématurité semble être une de ces conditions. Les événements potentiellement dangereux observés chez les agneaux prématurés montrent que les CRL sont probablement impliqués dans la pathogénèse des apnées/bradycardies du prématuré, phénomène fréquemment retrouvés en clinique. Quant à l'exposition à la fumée secondaire, elle est une condition néonatale qui modifie les réflexes obtenus suite à une stimulation laryngée sans induire de réflexes potentiellement dangereux. Les modifications observées suggèrent fortement que la fumée secondaire est un facteur de risque des malaises inopinés du nouveau-né et du syndrome de mort subite du nourrisson.

Mots clés

Chémoréflexes laryngés, Apnée du prématuré, Malaises graves du nourrisson, Syndrome de mort subite du nourrisson, Exposition à la fumée secondaire, Reflux laryngo-pharyngés

INTRODUCTION

Les premiers balbutiements de l'appareil respiratoire aérien remontent d'aussi loin qu'il y a 400 millions d'années, soit plusieurs millions d'années avant l'apparition de la vie aérienne. Pour des raisons encore inconnues, certains poissons, tels les Dipneustes (poissons pulmonés), ont dû développer une respiration aérienne pour assurer leur survie. Ainsi, grâce à l'acquisition d'un nouveau mode respiratoire, ces espèces de poissons pouvaient monter régulièrement à la surface de l'eau pour inspirer l'air ambiant (ROUX, 2002). L'acquisition d'une double respiration, soit aquatique et aérienne, avait certes des avantages mais comment faire pour éviter que le poisson ne puisse se noyer? Une valve de fermeture fut alors nécessaire pour éviter que le nouveau poumon soit inondé. Le larynx était né!

La fonction du larynx primitif fut donc la protection des voies aériennes inférieures (VAI) contre l'inondation, phénomène nommé chémoréflexes laryngés. Quatre cents millions d'année plus tard, cette fonction vitale semble être préservée, surtout parce que les voies aériennes supérieures (VAS) sont un carrefour commun pour l'alimentation et la respiration. L'évolution des espèces a, par contre, diversifié les fonctions du larynx faisant de lui un organe impliqué dans le contrôle fin du débit aérien au cours du cycle respiratoire et dans la production de la parole. Outre ces

fonctions essentielles, le larynx joue un rôle important dans plusieurs situations de la vie quotidienne, telles que toux, rire, hoquets, manœuvres d'expulsion (accouchement, défécation, miction) et port de lourdes charges (BARTLETT, 1989).

L'évolution des espèces a diversifié les fonctions du larynx, mais l'a rendu également de plus en plus complexe et sophistiqué. Par contre, la complexité a son revers! La protection des VAI contre l'aspiration, pourtant essentielle à la vie, peut entraîner des conséquences potentiellement dangereuses (ex : apnées et bradycardies du prématuré), voire mortelles, surtout dans la période néonatale.

Anatomie du larynx

Situé au carrefour aéro-digestif, le larynx est attaché en haut par la membrane thyrohyoïdienne (un ligament fibroélastique) à l'os hyoïde et en bas par le ligament cricotrachéal à la trachée (figure 1). Il est composé de trois grands cartilages (cricoïde, thyroïde et épiglote), de trois paires de petits cartilages (aryténoïde, corniculé et cunéiforme) et de plusieurs muscles intrinsèques (tableau 1). Outre les muscles intrinsèques, le larynx comprend plusieurs muscles extrinsèques qui permettent son déplacement de haut en bas ou d'avant en arrière, assurant ainsi les fonctions du larynx (DRAKE *et al.*, 2006).

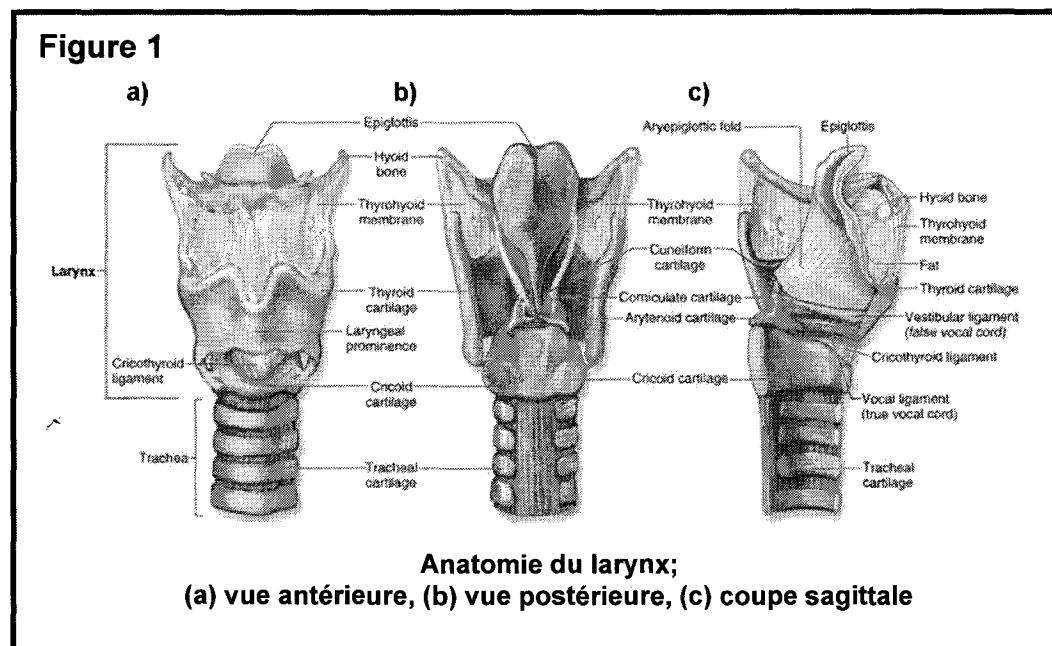


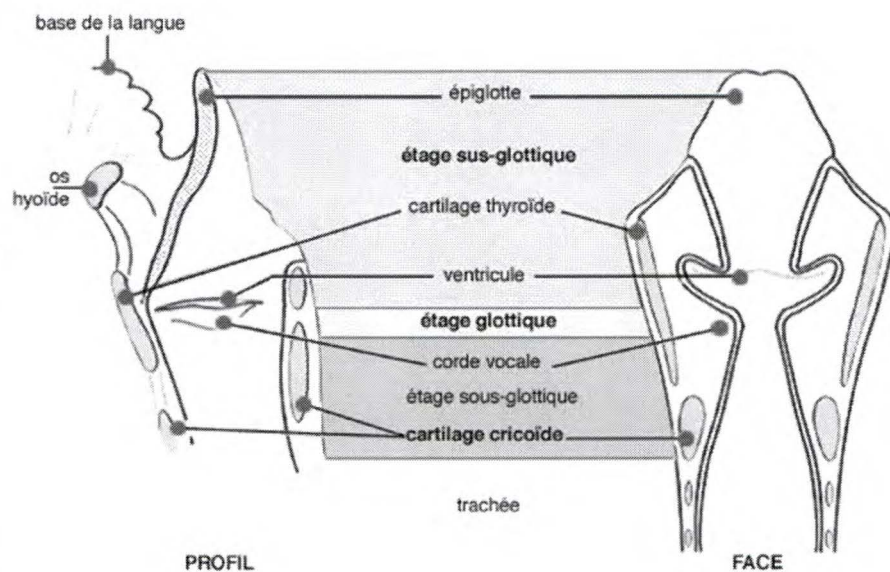
Tableau 1
Muscles intrinsèques du larynx

Muscles intrinsèques	Fonction
Cricothyroïdien	Translation antérieure et rotation vers le bas du cartilage thyroïde dans l'articulation cricothyroïdienne
Cricoaryténoïdien postérieur	Rotation externe et abduction du cartilage aryténoïde
Cricoaryténoïdien latéral	Abduction et rotation interne du cartilage aryténoïde
Aryténoïdien transverse	Adduction des cartilages aryténoïdes
Aryténoïdien oblique	Sphincter de l'entrée du larynx
Thyroaryténoïdien	Sphincter du vestibule et de l'entrée du larynx
Vocal	Réglage de la tension dans les replis vocaux

(Modifié de DRAKE *et al.*, 2006)

Le larynx est séparé en trois régions délimitées par des replis muqueux (bandes ventriculaires ou fausses cordes vocales en haut, et cordes vocales en bas) qui s'invaginent à l'intérieur de la cavité laryngée (figure 2). Au-dessus des bandes ventriculaires se trouve le vestibule laryngé; au-dessous des bandes ventriculaires et au-dessus des cordes vocales se trouve le ventricule laryngé; l'orifice triangulaire délimité par les cordes vocales latéralement, et l'espace interaryténoïdien en arrière est la glotte; finalement, la région sous-glottique ou infra-glottique ouvre sur la trachée (DRAKE *et al.*, 2006).

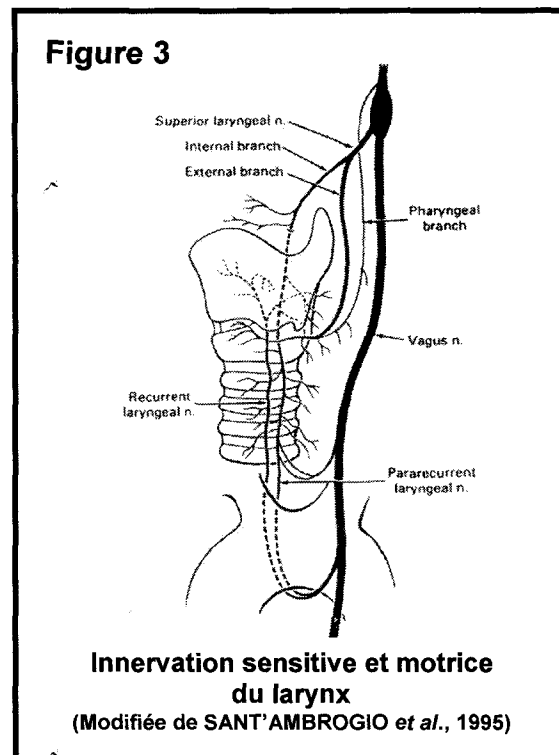
Figure 2



**Anatomie du larynx;
localisation des différentes régions du larynx**

1.1 Innervation du larynx

Deux branches du nerf vague, les nerfs laryngés supérieurs et les nerfs laryngés récurrents assurent l'innervation sensitive et motrice du larynx (figure 3) (YOSHIBA *et al.*, 2000). Les nerfs laryngés supérieurs, au nombre de 2 (nerf laryngé supérieur droit et gauche), se divisent en deux branches soit la branche interne, responsable de l'innervation sensitive du larynx, et la branche externe, responsable de l'innervation motrice du muscle crico-thyroïdien. Les nerfs laryngés récurrents, au nombre de 2 également, sont responsables de l'innervation sensitive de la région sous-glottique et de l'innervation motrice de tous les muscles intrinsèques du larynx à l'exception du muscle cricothyroïdien. À noter que l'origine du nerf



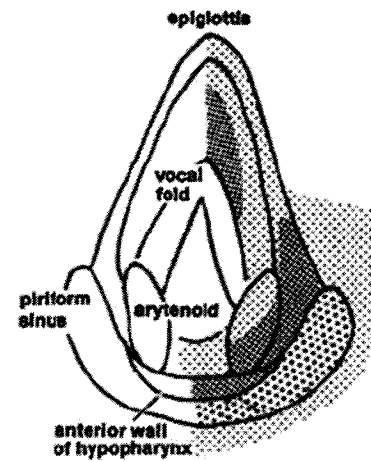
laryngé récurrent gauche est très basse dans la cage thoracique, au niveau de la crosse aortique qu'il contourne pour remonter jusqu'au niveau du larynx, en suivant le bord gauche de la trachée, juste en avant de l'œsophage. Une anastomose, l'anastomose de Galien, relie de chaque côté le nerf laryngé supérieur et le nerf laryngé récurrent jouant

probablement un rôle dans la fonction sensitive. De type unipolaire, les neurones afférents ont leur corps cellulaire situé dans le ganglion inférieur du nerf vague et font synapse au niveau du noyau du faisceau solitaire, dans le bulbe rachidien, (YOSHIBA *et al.*, 2000).

La densité de l'innervation sensitive du larynx n'est pas homogène et varie selon la localisation anatomique (figure 4). Cette variation semble surtout être un avantage d'adaptation dans la fonction de protection des VAI contre l'aspiration. La porte d'entrée du larynx, la région supra-glottique, contient une densité importante de fibres afférentes comparativement aux autres régions. La densité n'est pas homogène non plus au niveau même de la région supra-glottique, puisqu'elle est plus importante au niveau de la face

laryngée de l'épiglotte et des replis aryépiglottiques (YOSHIDA *et al.*, 2000). Les cordes vocales, quant à elles, contiennent une densité plus importante de fibres afférentes dans la région postérieure, vers l'œsophage, que dans la région antérieure (KOIZUMI, 1953). Il est intéressant de noter que la densité de fibres afférentes par unité de surface du larynx est nettement supérieure dans les nerfs des VAS par rapport

Figure 4



**Densité des afférences nerveuses
au niveau du larynx (vue
supérieure)**
(Modifiée de YOSHIDA *et al.*, 2000)

aux nerfs des VAI. En effet, chez les chats, le nerf laryngé supérieur contient 2400 fibres afférentes réparties sur quelques centimètres carrés seulement, comparativement à 4600 fibres afférentes au niveau des bronches, réparties sur une zone plus large (SANT'AMBROGIO, 1996). Les nerfs afférents de la muqueuse laryngée semblent également subir une maturation post-natale: le nouveau-né possède une prédominance de fibres non-myélinisées comparativement aux adultes. Chez le chien, 22% des fibres sont myélinisées à la naissance comparativement à 48% à l'âge de 60 jours et 90% à l'âge adulte (MILLER et DUNMIRE, 1976).

1.2 Histologie du larynx

Le larynx est composé principalement d'un épithélium respiratoire (épithélium pseudostratifié cilié) à l'exception de la région glottique où on retrouve un chevauchement entre un épithélium respiratoire et un épithélium malpighien (épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé). Les bandes ventriculaires possèdent un épithélium respiratoire tandis que les cordes vocales possèdent plutôt un épithélium malpighien (ULFIG, 2006).

1.3 Récepteurs du larynx

La muqueuse laryngée comprend une densité très importante de récepteurs, incluant plusieurs types de mécanorécepteurs et de chémorécepteurs. Continuellement, les afférences provenant des mécanorécepteurs – récepteurs à pression (70% des mécanorécepteurs), à proprioception (28% des mécanorécepteurs) ou à température (2% des récepteurs) – modifient la commande respiratoire centrale et modulent finement le rythme, la fréquence et l'amplitude ventilatoire (SANT'AMBROGIO *et al.*, 1996; WIDDICOMBE, 2001; REIX *et al.*, 2007). Ces récepteurs sont donc stimulés durant le cycle respiratoire normal. Les afférences provenant des chémorécepteurs, quant à elles, sont responsables des réflexes de protection de voies aériennes inférieures, et ne sont pas impliquées dans la modulation fine de la respiration. Les chémorécepteurs représentent un groupe plus hétérogène rendant ainsi la

classification plus compliquée. D'un point de vue physiologique, on distingue deux types de chémorécepteurs, les récepteurs aux irritants et les terminaisons des fibres C (WIDDICOMBE, 2001; REIX *et al.*, 2007). La première catégorie est stimulée autant par des substances chimiques (eau, fumée de cigarette, CO₂) que mécaniques et correspond à des fibres myélinisées de petit diamètre, les fibres A-delta. Les terminaisons des fibres C (fibres non-myélinisées) retrouvées au niveau de la muqueuse laryngée sont stimulées par des substances chimiques incluant capsaïcine, phénylbiguanide, anesthésiants volatiles, ammoniacque, produits inflammatoires, solutions acides et par l'augmentation de la température (FØRSBERG *et al.*, 1988; FOX, 1995; NAIDA *et al.*, 1996; MUTOH *et al.*, 1998). D'un point de vue morphologique, on distingue deux types différents au niveau de la muqueuse laryngée, des terminaisons libres et des bourgeons gustatifs (WIDDICOMBE, 2001). Les terminaisons libres représentent probablement au niveau du larynx les récepteurs aux irritants et les terminaisons des fibres C. Bien que retrouvés chez plusieurs espèces, le rôle des bourgeons gustatifs au niveau du larynx n'est actuellement pas clair. Ces bourgeons sont principalement retrouvés au niveau de l'épiglotte, des replis aryépiglottiques et du processus cunéiforme des cartilages aryénoïdes. Leur distribution, assez homogène parmi les espèces telles le chien (YAMAMOTO *et al.*, 1997) le chat (SHIN *et al.*, 1995), l'agneau (KOVAR *et al.*, 1979; SWEAZEY *et al.*, 1994) et le rat (KAZUTOSHI et YASURO, 2004), laisse penser qu'ils ne sont pas

impliqués dans la sensation du goût mais plutôt dans les chémoréflexes laryngés (BRADLEY, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2006).

Chémoréflexes laryngés

Les chémoréflexes laryngés (CRL), un ensemble de réflexes déclenchés suite à un contact entre un liquide et la muqueuse laryngée, sont les mécanismes de protection des VAI les plus importants. La présence d'un liquide, quel qu'il soit, sur la muqueuse laryngée, induit une fermeture laryngée, des apnées, des déglutitions, de la toux, une augmentation de la pression artérielle systémique et une vaso-constriction périphérique (THACH, 2008). Chez un sujet endormi, en plus des réflexes énumérés précédemment, des réactions d'éveil sont nécessaires afin encore une fois d'éviter l'aspiration. Les déglutitions et la toux servent principalement à expulser le liquide étranger tandis que les apnées et la fermeture laryngée servent à éviter l'aspiration dans les VAI. Finalement, l'augmentation de la pression artérielle systémique et la vaso-constriction périphérique contribuent à redistribuer le débit sanguin vers les organes nobles, phénomène essentiel lors d'épisode hypoxique (THACH, 2008). Chaque réponse individuelle des CRL est importante, mais c'est leur combinaison qui empêche l'aspiration. Si la réponse déclenchée est composée seulement d'apnées et de fermeture laryngée, mais qu'aucun élément n'expulse le liquide, l'aspiration est toujours possible lors de la reprise de la respiration (PICCKENS *et al.*, 1989). Souvent oubliée, la réaction d'éveil est pourtant une réaction essentielle pour la survie au même titre que la toux/déglutition ou apnée/fermeture laryngée (GILMARTIN et THOMAS,

2004; McNAMARA *et al.*, 1998). La réaction d'éveil implique une réponse autonome telle qu'une augmentation de la fréquence cardiaque, une augmentation de la pression artérielle systémique et finalement une augmentation de la fréquence et de l'amplitude respiratoire (HORNE *et al.*, 2004). De plus, chez un sujet endormi, la toux survient uniquement si la réaction d'éveil est présente (SULLIVAN *et al.*, 1978). Chez les mammifères, les CRL ne sont pleinement efficaces qu'après une maturation du système nerveux (THACH, 2001). En période néonatale, comparativement aux adultes où la maturation du système nerveux est maximale, des chémoréflexes laryngés immatures et exagérés sont fréquemment observés. Ces réflexes immatures et exagérés, d'origine vagale, sont bien souvent délétères et associent laryngospasme (fermeture laryngée excessive qui se poursuit même après que le stimulus déclenchant ait disparu), apnée prolongée, bradycardie et éventuellement hypoxémie (THACH, 2001).

Les années 2000 ont ouvert la voie à de nombreuses études portant sur les CRL en période néonatale. Que ce soit d'un point de vue clinique (première partie) ou physiologique (deuxième partie), les CRL prennent une place considérable, jour après jour, dans la tête de nombreux chercheurs et cliniciens, incluant moi.

★ Chémoréflexes laryngés... de la théorie à la clinique ★

2.1 Implications cliniques

Les néonatalogistes et les pédiatres connaissent trop bien les conséquences que peuvent avoir les CRL sur la vie des nourrissons. Plusieurs auteurs soutiennent l'idée que la stimulation des récepteurs de la muqueuse laryngée est impliquée dans les apnées du prématuré, les malaises graves du nourrisson (MGN) et fait partie des hypothèses pathogéniques du syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) (WÈTMORE, 1993; PAGE et JEFFERY, 2000; REIX *et al.*, 2007; LEITER et BOHM, 2007; KINNEY et THACH, 2009b).

• Apnées du prématuré

Être né avant la 37^{ème} semaine de gestation confère l'appellation de nouveau-né prématuré et expose à de nombreuses conditions liées principalement à l'immaturité. Les apnées sont une situation fréquente qui affecte de nombreux enfants prématurés dont la cause peut être assez variée (tableau 2). Cependant, bien souvent, aucune cause n'est trouvée responsable de ces apnées et on les définit alors comme des apnées du prématuré. Le dernier consensus définit les apnées du prématuré par un pause respiratoire ≥ 20 secondes ou ≥ 10 secondes si accompagnées de bradycardie (fréquence cardiaque ≤ 80 battements/minute) et/ou désaturation (saturation en O_2 80% - 85%) (FINER *et al.*, 2006). Par contre,

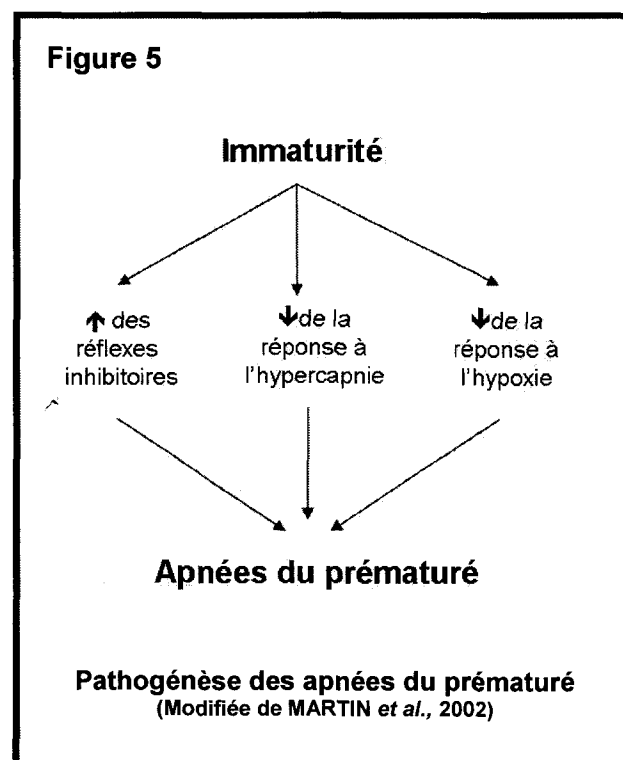
Tableau 2
Causes potentielles d'apnée du prématuré

Système nerveux central	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsion • Drogue • Hypoxie
Respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> • Pneumonie • Atélectasie • Syndrome de détresse respiratoire
Infectieux	<ul style="list-style-type: none"> • Sepsis • Entérocolite nécrosante • Méningite
Gastro-entérologie	<ul style="list-style-type: none"> • Perforation intestinale • Œsophagite
Métabolique	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoglycémie • Désordres électrolytiques • Hyperthermie/Hypothermie
Cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Hypotension/Hypertension • Insuffisance cardiaque • Hypovolémie

(Modifié de KILIEGMAN *et al.*, 2006)

cette définition n'est pas optimale et n'est pas acceptée de tous, car certaines apnées ≤ 10 secondes peuvent aussi entraîner des bradycardies et/ou désaturations cliniquement significative (SILVESTRI, 2009). Les apnées du prématuré sont observées virtuellement chez tous les nouveau-nés nés avant 29 semaines de gestation ou avec un poids ≤ 1000 g (STOKOWSKI, 2005; FINER *et al.*, 2006). Plus l'âge gestationnel diminue, plus l'incidence des apnées augmente. Ainsi, on estime que 54% des enfants nés entre 30 et 31 semaines de gestation et 7% des enfants entre 34 et 35 semaines de gestation souffrent d'apnées du prématuré (STOKOWSKI, 2005). Généralement, ces apnées sont résolues lorsque le nouveau-né atteint l'âge de 36 à 40 semaines postconceptionnel, mais il

n'est pas rare qu'elles persistent jusqu'à 44 semaines d'âge postconceptionnel (ABU-SHAWEESH et MARTIN, 2008). Les mécanismes exacts expliquant la survenue des apnées du prématuré restent encore aujourd'hui un mystère. Malgré tout, il semble évident que l'immaturité du contrôle cardiorespiratoire est en grande partie responsable des apnées/bradycardies/désaturations du prématuré. Histologiquement, l'immaturité se manifeste par une diminution des connections synaptiques, de l'arborisation dendritique et de la myélinisation des fibres nerveuses. Physiologiquement, l'immaturité du contrôle cardiorespiratoire se manifeste surtout par une réponse à l'hypercapnie/hypoxie inadéquate et/ou par une réponse exagérée à la stimulation des réflexes inhibiteurs vagues, dont ceux issus des récepteurs laryngés (CRL) (figure 5). On estime que plus de



70% des apnées du prématuré sont causées par les CRL secondaires à la survenue de reflux laryngo-pharyngé (THACH, 2008). Pour remédier à ce problème, les néonatalogistes utilisent différentes stratégies dont les plus fréquentes sont l'utilisation de stimulant respiratoire (caféine) ou

l'utilisation de la ventilation à pression positive (CPAP) (STOKOWSKI, 2005). L'utilisation de médicament anti-reflux fait encore aujourd'hui, l'objet de discussion passionnées (FINER *et al.*, 2006).

• Malaises graves du nourrisson

Longtemps appelé à tort « near miss sudden infant death syndrome », les malaises graves du nourrisson (MGN) se définissent comme étant un événement d'apparition brutale entraînant des modifications du tonus (surtout hypotonie), de la coloration (pâleur ou cyanose), de l'état de conscience et/ou des apnées centrales ou obstructives faisant penser aux témoins que le pronostic vital est en jeu dans l'immédiat et nécessitant des manœuvres de réanimation ou des stimulations vigoureuses (FOUCAUD *et*

Tableau 3
Causes potentielles de malaises graves du nourrisson

Système nerveux central	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsion • Hypertension intracrânienne
Respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalie des voies respiratoires • Obstruction des voies respiratoires
Infectieux	<ul style="list-style-type: none"> • Sepsis • Infection des voies respiratoires • Méningite
Gastro-entérologie	<ul style="list-style-type: none"> • Reflux gastro-œsophagien • Volvulus et invagination
Métabolique/Endocrinien	<ul style="list-style-type: none"> • Galactosémie • Trouble de l'oxydation des acides gras • Anomalie du cycle de l'urée
Cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Arythmie • Cardiomyopathie

(Modifié de TURGEON *et al.*, 2008)

al., 2004). Les malaises graves touchent surtout les nourrissons âgés de moins de 6 mois, avec une prévalence variant de 1 à 2% (BROOKS, 1992; EDNER *et al.*, 2007). L'étiologie du malaise est variable (tableau 3), mais souvent, on la classifie d'idiopathique. La cause la plus souvent évoquée pour expliquer le malaise est la survenue de reflux gastro-oesophagien, avec une prévalence variant entre 18 et 66% selon les études (McKELVELVEY *et al.*, 2001; McGOVERN et SMITH, 2004; MAGGIO *et al.*, 2006; SEEMA et SHARIEFF, 2007).

- **Syndrome de mort subite du nourrisson**

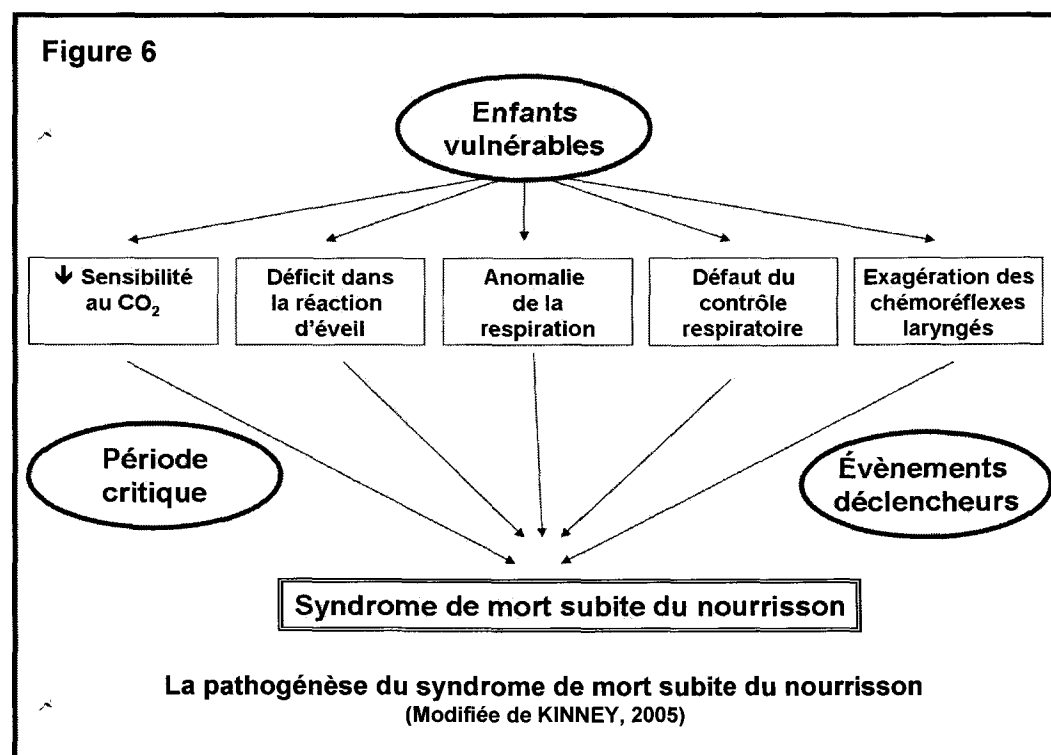
Depuis le début des années 70, la définition du syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) a constamment évolué. Actuellement, on la définit comme étant un décès subit et inattendu et durant le sommeil d'un nourrisson de moins d'un an, qui demeure inexpliqué après une enquête approfondie (autopsie complète par un pathologiste expert de la SMSN, revue de la scène du décès, revue de l'histoire clinique) (BAJANOWSKI *et al.*, 2007). Dans les pays industrialisés, le SMSN est la première cause de mortalité chez les nourrissons âgés de 1 mois à 1 an (MOON et FLU, 2007), avec des incidences variant entre 0,09/1000 naissance (Japon) à 0,8/1000 naissance (Nouvelle-zélande) (HUNT et HAUCK, 2006). Malheureusement, aux États-Unis, 2500 décès de nourrissons surviennent annuellement sans qu'on ne puisse identifier une cause précise, laissant les parents avec une multitude de questions sans réponse (MOON *et al.*,

2007). Certaines nations telles les premières nations américaines et canadiennes ou les aborigènes d'Australie, ont une prévalence de mort subite du nourrisson 2 à 3 fois plus élevée que la prévalence nationale (MOON *et al.*, 2007). Plusieurs facteurs de risque, certains maternels et d'autres infantiles, ont été attribués au SMSN. Parmi les facteurs de risque maternels ou anténatals, notons, en outre, la consommation d'alcool, de drogue ou de tabac, le faible statut économique ou d'éducation, et le retard de croissance intra-utérin. Le sexe masculin, la race, la prématurité, la position couchée sur le ventre, l'utilisation d'une literie moelleuse, font partie des autres facteurs de risque identifiés (HUNT et HAUCK, 2006; MOON et FUL, 2007; KINNEY et THACH, 2009b). Avant les années 90, le principal facteur de risque du SMSN était la position couchée sur le ventre. En 1992, l'Association américaine de pédiatrie a lancé une vaste campagne de publicité s'intitulant « dodo sur le dos ». Cette campagne a, heureusement, permis de réduire l'incidence du SMSN de 50% à 90% (MOON et FLU, 2007). Actuellement, le principal facteur de risque semble être lié à une exposition à la fumée secondaire périnatale, avec une augmentation alléguée des risques de 5 fois pour l'exposition prénatale et de 2 à 3 fois pour l'exposition postnatale (ANDERSON et COOK, 1997; HALSTROM *et al.*, 2005). Malgré les avancées considérables, il n'existe actuellement aucune cause précise et encore moins unique qui puisse expliquer le dénouement dramatique chez les jeunes victimes. L'étiologie du SMSN semble être multifactorielle. Pour expliquer la pathogénèse du

SMSN, en 1994, Filiano JJ a proposé le modèle du « triple risque », modèle qui est encore d'actualité (FILIANO et KINNEY, 1994). Le modèle du « triple risque » stipule que la mort survient lorsque trois éléments sont présents simultanément (figure 6) soit 1) un enfant vulnérable, 2) une période critique du développement et 3) un événement déclencheur.

Enfants vulnérables

Depuis que le modèle a été proposé, la question qui revient sans cesse mais n'a pas encore de réponse définitive est: qu'est ce qui rend les nouveau-nés vulnérables au point de favoriser le SMSN? La vulnérabilité des nouveau-nés semble être influencée par des facteurs intrinsèques ou par des facteurs environnementaux (KINNEY *et al.*, 2009a). Les facteurs de risque intrinsèques comprennent autant les facteurs de risque



développemental [la prématurité, le retard de croissance intra-utérin, le sexe masculin (ratio de 6 garçons pour 4 filles), la race] que les polymorphismes génétiques (MOON *et al.*, 2007; KINNEY *et al.*, 2009a). Cette dernière catégorie fait l'objet de plusieurs recherches intensives, car certains polymorphismes ont été retrouvés, entre autre, au niveau de l'interleukine 1L-10 et du transporteur de recapture de la sérotonine chez les victimes du SMSN (OPDAL et ROGNUM, 2004; LOGHMANEE et WEESE-MAYET, 2007; HUNT et HAUCK, 2006). Certaines équipes croient même que le système sérotoninergique est la cible pour expliquer le SMSN, croyance basée sur le fait que de 50 à 70% des victimes du SMSN ont des anomalies au niveau de leur système sérotoninergique (KINNEY *et al.*, 2009a). Il n'est pas claire, encore aujourd'hui, l'impact physiologique des anomalies du système sérotoninergique, s'agit-t-il plutôt d'une augmentation ou d'une diminution de la sérotonine au niveau du tronc cérébral? Bien entendu, les fonctions essentielle du système sérotoninergique, (régulation du calibre des VAS, de la respiration, de la thermorégulation, des stades de sommeil et de la réaction d'éveil,) au niveau du tronc cérébral laissent croire qu'une anomalie dans ce système pourrait avoir une influence majeure dans l'homéostasie du nouveau-né. (KINNEY *et al.*, 2009a; KINNEY et THACH, 2009b). L'implication de d'autres neurotransmetteurs et de d'autres récepteurs, dont les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, ont été proposés pour avoir un rôle à jouer dans le SMSN (KINNEY *et al.*, 2009a). Outre les facteurs de risque

intrinsèques, les facteurs environnementaux prennent une place considérable dans l'augmentation de la vulnérabilité. Ces facteurs incluent l'exposition à la fumée secondaire périnatale ou à certaines drogues (alcool, cocaïne, opiacés, ...) pour ne nommer que ceux-là (MOON *et al.*, 2007; HUNT et HAUCK, 2006). Depuis les dernières années, les connaissances supportent de plus en plus l'idée que la vulnérabilité est affectée seulement s'il y a la combinaison entre les facteurs de risque intrinsèques et les facteurs de risque environnementaux (interaction gène-environnement). Ainsi, par exemple, un nourrisson qui possède un polymorphisme quelconque n'aura aucune conséquence potentiellement dangereuse s'il n'est jamais exposé à la fumée secondaire (HUNT, 2005). Finalement, il est probable qu'à côté des polymorphismes nucléotidiques, l'épigénétique (modifications transmissibles d'une génération à l'autre mais qui ne sont pas codées par la séquence ADN), dont l'importance apparaît actuellement de plus en plus clairement dans nombre de pathologies, a certainement un rôle important à jouer dans le SMSN (NEZELOF, 2006; STAINES, 2005). Il est intéressant de comprendre l'influence de certains facteurs sur la vulnérabilité des nouveau-nés, mais concrètement, il semble que ces facteurs peuvent induire un défaut du contrôle respiratoire (par exemple anomalies du patron respiratoire, exagération des chémoréflexes laryngés, diminution de la sensibilité à l'hypoxie et/ou au CO₂ avec diminution de la réaction d'éveil, perturbations du gasping anoxique) (KINNEY et THACH, 2009b). Bien entendu, l'hypothèse du « nourrisson

vulnérable » peut s'appliquer à d'autres fonctions vitales que la fonction respiratoire. Ainsi, le système cardiovasculaire peut aussi être concerné, soit au niveau de son contrôle central, soit au niveau d'anomalies de la rythmicité des cellules myocardiques elles-mêmes (channelopathies) (TESTER *et al.*, 2007; VAN NORSTRAND et ACKERMAN, 2009). Enfin, parmi les autres systèmes, le système de défense contre les infections semble pouvoir être impliqué en lui-même (polymorphismes pour l'IL-10) (OPDAL et ROGNUM, 2004; HUNT *et al.*, 2006; LOGHMANEE *et al.*, 2007). Dans cette thèse, nous nous centrerons avant tout sur les événements cardiorespiratoires inclus dans les chémoréflexes laryngés.

Période critique du développement

Une période critique du développement se définit comme étant une période où le système nerveux est sensible aux influences environnementales. Dans le cas du SMSN, la période de vulnérabilité se situe dans les premiers 6 mois avec un pic entre 2 et 4 mois (KINNEY, 2005). Cette période critique représente une période où les contrôleurs cérébraux des grandes fonctions vitales, en particulier au niveau du tronc cérébral, s'adaptent à leur nouvel environnement extra-utérin, induisant une instabilité de plusieurs fonctions autonomiques telles que cardio-respiratoires, thermique et du rythme circadien (KINNEY *et al.*, 2009a).

Évènements déclencheurs

Un nouveau-né vulnérable qui entre dans une période critique de son développement peut n'avoir aucun problème tant et aussi longtemps qu'il ne subit pas un événement déclencheur. Ces événements incluent bien entendu la position couchée sur le ventre mais également une température élevée dans la chambre du nouveau-né, une infection des VAS, l'utilisation d'une literie moelleuse facteur d'étouffement, le fait de coucher dans le même lit que les parents, des reflux laryngo-pharyngés (PAGE et JEFFERY, 2000; HUNT et HAUCK, 2006; KINNEY *et al.*, 2009a). Mais, peu importe l'événement déclencheur, ces événements placent le nouveau-né dans des situations potentiellement dangereuses avec des risques importants d'asphyxie (KINNEY et THACH, 2009b)

2.2 Liquides et chémoréflexes laryngés

Les CRL sont impliqués, comme il a été mentionné, dans certaines entités cliniques et peuvent être déclenchés par des sécrétions des VAS, la prise orale de lait ou de médicaments (polyvitamines, dompéridone), la nébulisation d'eau à partir d'une tubulure de ventilation nasale ou par des reflux laryngo-pharyngés (acides ou non acides) (REIX *et al.*, 2007).

• Sécrétions des voies aériennes supérieures

La salive est très peu étudiée dans le cadre des CRL. Cependant, une étude de Pickens DL et al (PICKENS *et al.*, 1988) a montré que des

apnées/bradycardies, des déglutitions et des obstructions des VAS ont lieu spontanément, sans stimuli détectés, suggérant la présence de stimuli endogènes (telle la salive) dans le déclenchement des CRL.

- **Lait**

Depuis longtemps, il est connu que des apnées/bradycardies surviennent fréquemment durant et après l'alimentation chez les nouveau-nés prématurés (GAUDA, 2003). Un des mécanismes causal suspecté est bien entendu la stimulation des récepteurs laryngés (MILLER et GEENOUGH, 2004). Lors de l'alimentation, qu'il soit par allaitement ou par biberon, il doit exister une coordination très stricte entre succion, déglutition et respiration (PRAUD et REIX, 2005; Lau C, 2007). Chez un nouveau-né à terme, cette coordination est le plus souvent mature et aucun liquide n'atteint la muqueuse laryngée. Cependant, une mauvaise coordination durant la prise du biberon chez le nouveau-né peut faire en sorte que le lait pénètre dans le vestibule laryngé et déclenche des CRL (GAUDA, 2003; REIX *et al.*, 2007). Certaines études des années 1970 et 1980 supportent les observations cliniques et montrent que le lait peut induire une stimulation des récepteurs du nerf laryngé supérieur (STOREY et JOHNSON, 1975; HARDING *et al.*, 1978) et entraîner des apnées prolongées chez les cochonnets (DOWNING et LEE, 1975; LEE *et al.*, 1977) et les chiots (BOGG et BARTLETT, 1982) anesthésiés. Par contre, une autre étude, effectuée chez les chiots âgés de 2 semaines, montrent qu'une injection de

lait sur la muqueuse laryngée n'a aucun effet sur la respiration, le cœur ou la fermeture laryngée (PARK *et al.*, 2001).

- **Reflux laryngo-pharyngés**

Les reflux (acides ou non-acides) sont communs autant chez les nouveau-nés prématurés que les nouveau-nés à terme et résultent, entre autres, d'une immaturité du sphincter inférieur de l'œsophage (POETS, 2004). Les reflux surviennent spontanément chez les nouveau-nés, sans nécessairement être apparents cliniquement (GOUYON *et al.*, 1986; VANDENPLAS et SACRE-SMITS, 1987; JEFFERY et HEACOCK, 1991). Les reflux laryngo-pharyngés sont considérés par plusieurs experts, dont notre équipe, comme étant l'un des déclencheurs principaux des CRL (WETMORE, 1993; THACH, 1997; THACH, 2000; PAGE et JEFFERY, 2000; GAUDA, 2003; REIX *et al.*, 2007; KINNEY et THACH, 2009b). De nombreuses études ont montré un lien causal entre des apnées prolongées et des régurgitations de liquide gastrique et ce, dès les années 1970 (LEAPE *et al.*, 1977; HERBST *et al.*, 1978; PAGE et JEFFERY, 2000). Les événements cardiorespiratoires potentiellement dangereux, observés suite à un reflux, semblent liés à une immaturité des déglutitions et des réactions d'éveil, faisant en sorte que le liquide atteint la muqueuse laryngée (McKELVEY *et al.*, 2001). Cependant, le rôle des reflux laryngo-pharyngés dans l'étiologie des apnées du prématuré est, encore aujourd'hui, le sujet d'une controverse passionnée. Certains experts défendent l'idée que les

reflux laryngo-pharyngés ne sont pas impliqués dans la pathogénèse des apnées/bradycardies du nouveau-né (BARRINGTON *et al.*, 2002; POETS, 2004; BANCALARI, 2005; MOLLOY *et al.*, 2005).

★Chémoréflexes laryngés ... de la clinique à la physiologie ★

3.1 Origine potentielle des chémoréflexes laryngés chez le nouveau-né

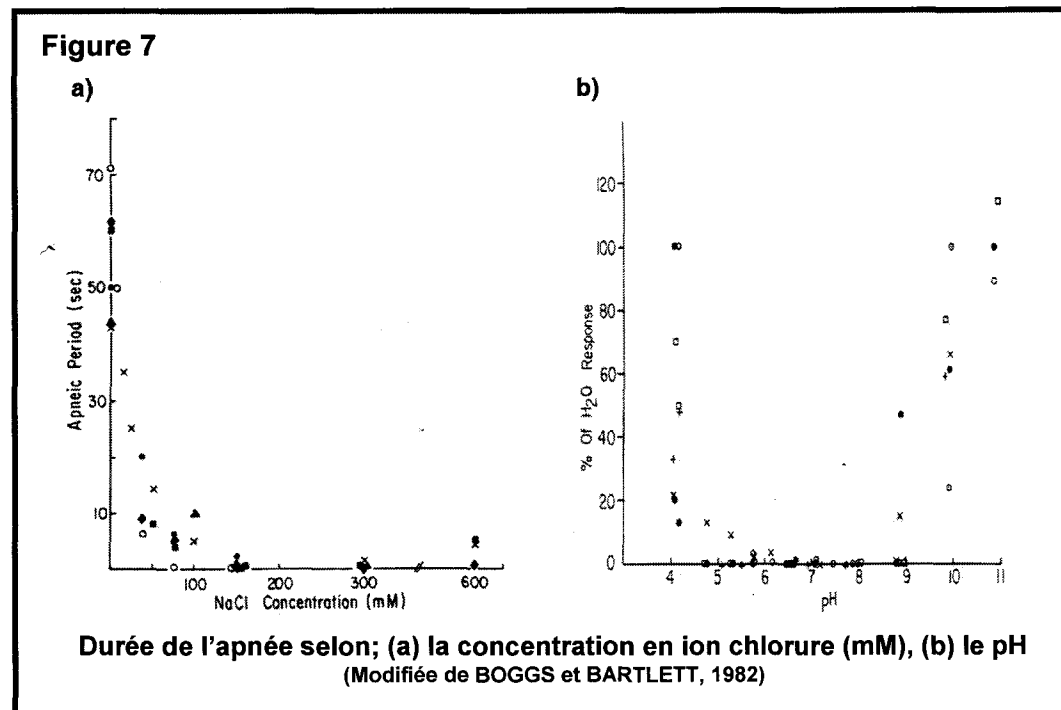
Les CRL, chez les nouveau-nés, sont la conséquence probable de mécanismes de protection pulmonaire retrouvés chez le fœtus et qui persistent au-delà de la naissance (THACH, 2001). Alors qu'il est encore en plein développement, le fœtus est entouré de liquide amniotique qu'il peut, dès la vingtième semaine de gestation, déglutir régulièrement, permettant ainsi le maintien d'un volume intra-utérin approprié (CHAN *et al.*, 1997; ROSS et NIJLAND, 1998). Ces phénomènes apparaissent presque en même temps que le fœtus exerce ses premiers mouvements respiratoires (THACH, 2001). Le fœtus doit donc se prémunir afin d'éviter l'aspiration du liquide amniotique dans les VAI, évènement qui pourrait être délétère. Le fœtus s'est ainsi muni d'un système efficace afin d'éviter l'aspiration de toute substance dont la composition diffère du liquide pulmonaire présent dans les VAI. La composition chimique du liquide pulmonaire et du liquide amniotique (présent dans les VAS) diffère principalement grâce à sa concentration en ions chlorure,

approximativement 170 mEq/L et 80 mEq/L respectivement (BLAND, 1990). Par conséquent, des apnées prolongées sont fréquemment observées en période prénatale suite au contact du liquide amniotique avec la muqueuse laryngée, mais elles ne représentent aucun risque pour le fœtus dont les échanges gazeux s'effectuent encore *via* le lien maternel. Par contre, le système dont s'est doté le fœtus pour éviter l'aspiration constitue paradoxalement un danger potentiel après la naissance. En effet, les CRL de type foetal (apnées/bradycardies) peuvent entraîner des conséquences dramatiques chez le nouveau-né dont les échanges gazeux s'effectuent maintenant *via* les voies aériennes. Cette séquence d'évènements qui se déroule entre la vie intra-utérine et extra-utérine n'est pas sans rappeler l'origine du larynx. Tout comme les poissons pulmonés, les nouveau-nés possèdent pour assurer leur survie, une valve capable d'éviter l'entrer de liquide dans les VAI.

3.2 Chémoréflexes laryngés en période néonatale

Les premières observations des CRL en période néonatale par Johnson en 1972 ont montré que l'application d'eau sur la muqueuse laryngée déclenche des CRL immatures caractérisés par apnée, bradycardie et hypoxémie chez l'agneau (JOHNSON *et al.*, 1975). Par la suite, d'autres études ont montré que l'application d'eau chez les cochonnets anesthésiés entraîne des apnées prolongées suivies par du gasping et parfois la mort (DOWNING et LEE, 1975; LEE *et al.*, 1977). Même si ces réponses

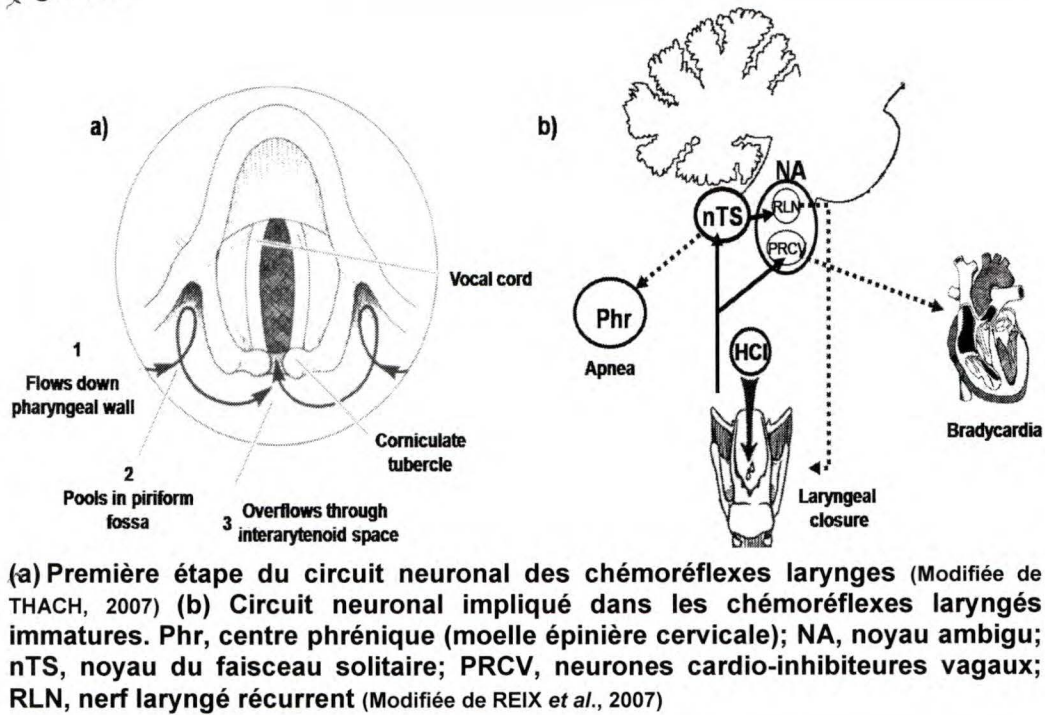
cardiorespiratoires immatures sont connues depuis longtemps, on ne comprend les mécanismes physiologiques que depuis une vingtaine d'années. Donna Bogg et Bartlett, en 1985, ont conclu que la composition chimique des solutions s'appliquant sur le larynx est importante dans la genèse des CRL. Il est généralement admis que les ions chlorures sont physiologiquement les éléments les plus importants dans les CRL. Plus une solution appliquée sur la muqueuse laryngée est pauvre en ions chlorures (seuil de 80 à 100mM), plus les apnées déclenchées sont importantes (figure 7a). Cette étude renforce l'hypothèse que l'origine des CRL immatures provient de la période intra-utérine. Les récepteurs de la muqueuse laryngée se sont spécialisés pour reconnaître le liquide amniotique du liquide pulmonaire de par leur concentration en ions chlorures, phénomène persistant en période néonatale. Outre les solutions faibles en ions chlorures, cette même équipe a démontré que le pH et une concentration élevée en potassium sont aussi des caractéristiques importantes dans la survenue des apnées. Seules les solutions extrêmement acides ($\text{pH} < 4,5$) ou basiques ($\text{pH} > 8,7$) et une concentration de potassium au-delà de 75 mEq/l déclenchent des apnées (figure 7b) (BOGG et BARTLETT, 1982). Cette constatation a une importance primordiale, car des solutions acides peuvent fréquemment atteindre la muqueuse laryngée durant la période néonatale.



3.3. Circuit neuronal impliqué dans les chémoréflexes laryngés

Que se passe-t-il lorsqu'un liquide se retrouve dans l'hypopharynx et le moment où les CRL sont déclenchés? Que ce soit lors d'un reflux ou de l'alimentation, l'observation endoscopique montre qu'avant d'atteindre le vestibule laryngé le liquide remplit tout d'abord une petite cavité située de chaque côté du larynx nommée sinus piriforme. Une fois le sinus piriforme rempli, le liquide atteint l'espace inter-aryténoïdien puis le vestibule laryngé et stimule les récepteurs de la muqueuse laryngée (figure 8a) (PICKENS *et al.*, 1988; PICKENS *et al.*, 1989; THACH, 2007). Le circuit neuronal impliqué dans les CRL immatures est illustré dans la figure 8b. Lorsqu'un liquide stimule les récepteurs laryngés, l'information est alors propagée *via* le nerf laryngé supérieur jusqu'au noyau du faisceau solitaire situé dans le

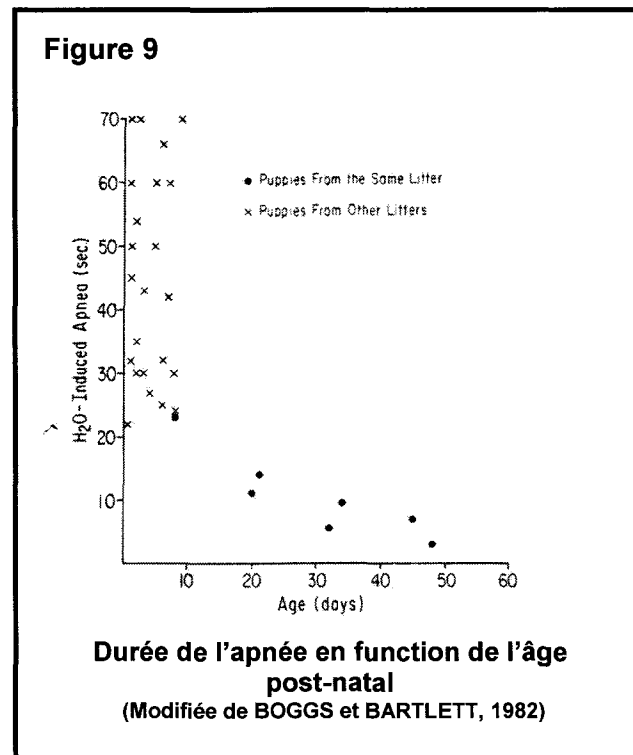
Figure 8



bulbe rachidien. De là, l'information est intégrée et acheminée vers des neurones efférents pour influencer l'activité du nerf phrénique (apnée), du nerf laryngé récurrent (laryngospasme) et du nerf vague (bradycardie).

3.4 Maturation des chémoréflexes laryngés

Les réflexes cardiorespiratoires délétères semblent s'atténuer avec l'âge postnatal, laissant la place à des mécanismes de protection des VAI (déglutitions, toux, réaction d'éveil) plus adaptés à la situation. Ainsi, la durée de l'apnée est inversement proportionnelle à l'âge postnatal (figure 9) (BOGGS et BARTLETT, 1982) et chez les adultes, les apnées sont rares, la toux, la déglutition et les réactions d'éveil sont les principales composantes des CRL (SULLIVAN *et al.*, 1978; WIDDICOMBE, 2001). Les



changements observés durant la maturation des CRL semblent être le résultat d'une maturation centrale plutôt qu'une diminution de la sensibilité ou un changement dans la distribution des récepteurs (STOREY et JOHNSON, 1975; BOGGS et BARTLETT, 1982; THACH,

2007).

3.5 Chémoréflexes laryngés chez les nouveau-nés à terme

De nombreuses études suggèrent que les CRL peuvent être responsables des apnées/bradycardies chez les nouveau-nés à terme (STOREY *et al.*, 1975; JOHNSON *et al.*, 1975; DOWNING et LEE, 1975; LEE *et al.*, 1977; HARDING *et al.*, 1978; SULLIVAN *et al.*, 1978; HARNED *et al.*, 1978; KOVAR *et al.*, 1979; LUCIER *et al.*, 1979; BOGGS et BARTLETT, 1982; LANIER *et al.*, 1983; SLADEK *et al.*, 1993). Cependant, la majorité des études effectuées sur les CRL ne reflète pas ce qui se passe en pratique. Premièrement, la majorité des études portant sur les CRL en période néonatale a été réalisée en utilisant l'eau distillée pour introduire un CRL,

alors que l'eau distillée n'est pas un stimulus mis en cause à cet âge en clinique. Ainsi, malgré la pertinence clinique évidente, peu d'études ont évalué l'effet d'une solution acide ou d'une solution de lait sur la muqueuse laryngée. Deuxièmement, en plus d'utiliser l'eau distillée, la majorité des études s'effectue avec un modèle animal anesthésié ou sédationné, qui bien souvent engendre une dépression respiratoire, résultats démontrés par une étude sur l'effet de la prométhazine sur les CRL chez les cochonnets (McKELVERY *et al.*, 1999). Troisièmement, la trachéotomie a été beaucoup utilisée dans les différentes études pour induire une stimulation de la glotte, alors il faut se questionner sur la possibilité que la région stimulée (région sous-glottique de la trachée) puisse affecter les résultats. Finalement, la majorité des études possède un manque criant de standardisation et/ou évalue seulement un aspect des CRL, surtout les paramètres respiratoires. Alors, qu'en est-il vraiment des nouveau-nés à terme?

Une étude de notre laboratoire, qui a fait l'objet de ma maîtrise, s'est penchée sur la question. L'étude chez l'agneau à terme (4-5^{ème} jour postnatal) a démontré qu'en l'absence de sédation et durant le sommeil calme (voir tableau 4 pour un résumé des stades de conscience chez les nouveau-nés et l'adulte), les CRL sont de type mature c'est-à-dire sans apnée ou bradycardie significative cliniquement (figure 10) (ST-HILAIRE *et al.*, 2005). Les mécanismes de protection tels que les déglutitions, toux et

réactions d'éveil sont au centre des réponses observées suite à une stimulation laryngée, prévenant ainsi l'aspiration des liquides dans la trachée. Ces résultats sont quelques peu différents de la littérature, rapportant des apnées et bradycardies significatives, mais s'explique facilement par une différence dans les conditions expérimentales entre les études. Une différence majeure est probablement liée à l'absence de sédation dans mon étude sur les agneaux à terme.

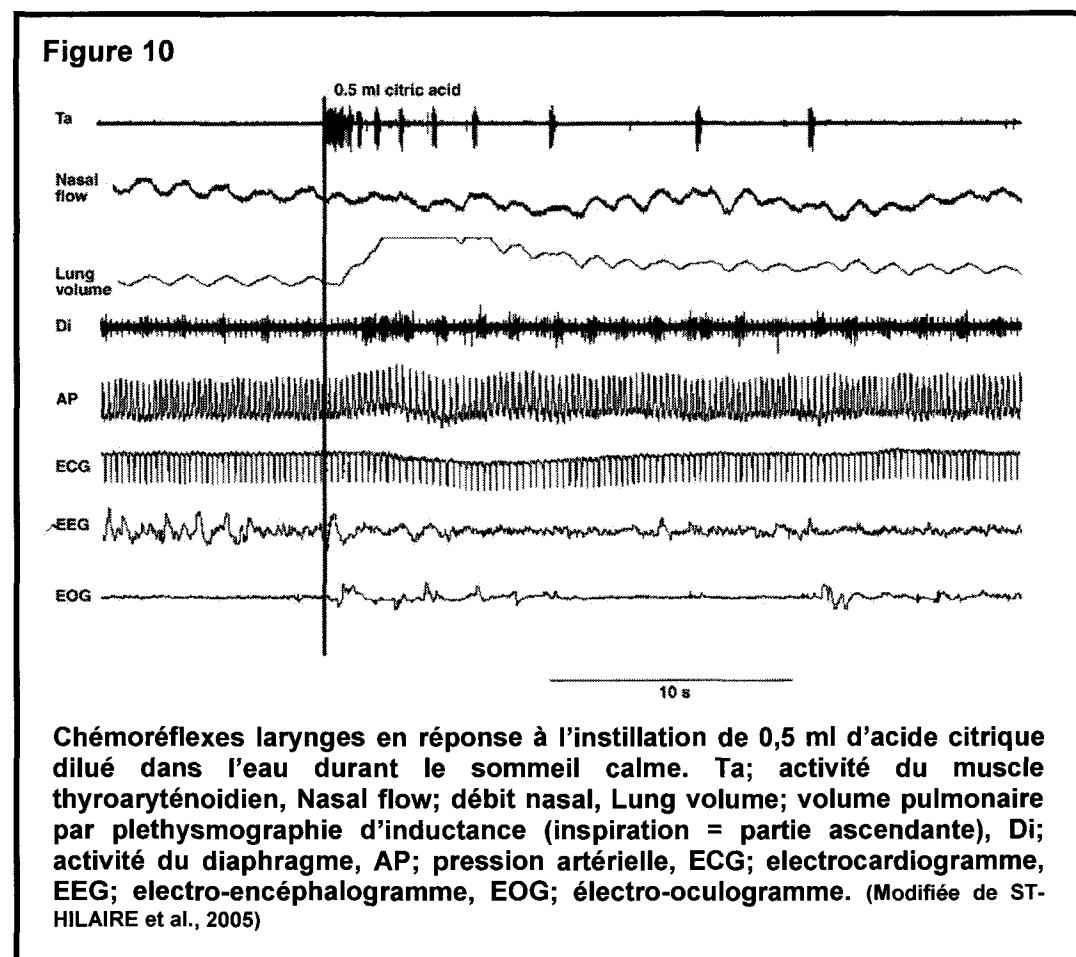
Tableau 4
Stades de conscience

Nouveau-nés	Éveil
Jusqu'à 6 mois environ	Sommeil <ul style="list-style-type: none"> • Sommeil calme (nREM) • Sommeil agité (REM)
Adultes	Éveil Sommeil <ul style="list-style-type: none"> • Sommeil lent <ol style="list-style-type: none"> 1. Somnolence 2. Sommeil léger 3. Sommeil profond 4. Sommeil très profond • Sommeil paradoxal

(Modifié de DAVIS *et al.*, 2004)

Malgré plusieurs études antérieures contradictoires, les résultats obtenus chez l'agneau à terme sont congruents avec les observations cliniques chez le nouveau-né humain à terme où les apnées/bradycardies sont des évènements rares, en dehors des cas de MGN (1-2% des nourrissons). Cependant, une analyse détaillée de la variabilité cardiaque chez ces mêmes agneaux à terme montre que même en l'absence de réponse

cardio-respiratoire significative et en l'absence d'hypoxie, le tonus sympathique-parasympathique est modifié dans le sens d'une augmentation de la variabilité cardiaque (BEUCHÉE *et al.*, 2007). Ces résultats intéressants supportent donc l'idée que les bradycardies peuvent survenir indépendamment des apnées significatives.



3.6 Facteurs environnementaux et chémoréflexes laryngés

Les néonatalogistes et les pédiatres constatent, jour après jour, que la majorité des nouveau-nés ont, comme illustré dans le paragraphe ci-dessus, des mécanismes de protection des VAI. Par contre, ces mêmes spécialistes reçoivent également quelques nouveau-nés aux prises avec des apnées/bradycardies/désaturations secondaires à la présence d'un liquide sur la muqueuse laryngée (malaise grave du nourrisson). Ainsi, pourquoi la majorité des nouveau-nés ont des mécanismes de protection tandis qu'une certaine proportion de nouveau-nés a plutôt des réflexes de type foetal potentiellement dangereux?

Certains facteurs extérieurs semblent aggraver la fréquence et la sévérité des conséquences cardiorespiratoires des CRL et ainsi conduire aux conséquences dramatiques. Ces facteurs comprennent, par exemple, l'hypoxie (LANIER *et al.*, 1983; WENNERGREN *et al.*, 1989; SLADEK *et al.*, 1993), une infection par le virus respiratoire syncytial (PICKENS *et al.*, 1989; LINDGREN *et al.*, 1992; LINDGREN et GROGAARD, 1996), et l'hyperthermie (XIA *et al.*, 2008). Certaines études, incomplètes et limitées, semblent conclure que la prématurité et la nicotine sont des conditions néonatales favorisant la survenue de réflexes potentiellement dangereux.

- **Chémoréflexes laryngés et prématurité**

Les naissances prématurées surviennent dans environ 6 à 12% des naissances dans les pays industrialisés (TURGEON *et al.*, 2007). Bien qu'il soit reconnu que les CRL peuvent être responsables d'apnées du prématuré, une seule étude animale a étudié l'effet de la prématurité sur les CRL en utilisant une solution d'eau distillée via une trachéotomie (MARCHAL *et al.*, 1982). Il semble évident que l'utilisation d'eau distillée et de la trachéostomie pose beaucoup de questions concernant la pertinence clinique. Les situations où un nouveau-né se retrouve exposé à une solution d'eau distillée dans la cavité buccale sont probablement rares. La trachéotomie pose la question de la spécificité des récepteurs (supra-glottique, sous-glottique, et/ou trachéobronchique). Finalement, quelle est vraiment l'influence de la prématurité sur les CRL?

- **Chémoréflexes laryngés et exposition à la fumée secondaire**

Problème de santé publique, l'exposition à la fumée secondaire est maintenant considéré comme le principal facteur de risque du SMSN. Malgré la pertinence clinique évidente, l'effet de l'exposition postnatale à la fumée secondaire n'a jamais été décrit dans le cadre des CRL.

Objectif de mon projet de doctorat

Il y a 7 ans, le laboratoire du Dr. Praud s'est engagé dans un vaste programme de recherche sur les CRL chez l'agneau nouveau-né à terme et prématuré. Mon projet de doctorat s'intègre parfaitement dans ce programme dont l'objectif est d'étudier l'influence de certains facteurs extérieurs sur les CRL.

Influence de la prématurité sur les CRL

L'objectif principal de cette première étude est de vérifier l'hypothèse que la prématurité augmente la sévérité des événements cardio-respiratoires lors des CRL, en utilisant un modèle d'agneau prématuré.

Les objectifs secondaires sont d'étudier :

- S'il existe une maturation postnatale des CRL chez l'agneau prématuré
- Si les résultats obtenus dépendent de la solution utilisée (eau distillée, acide chlorhydrique à pH 2, et sérum physiologique)
- Si les résultats obtenus dépendent des stades de conscience (sommeil calme, sommeil agité et éveil)

Influence d'une exposition post-natale à la fumée secondaire

L'objectif principal de cette deuxième étude est de vérifier l'hypothèse qu'une exposition postnatale de 15 jours à la fumée secondaire entraîne des événements cardiorespiratoires plus importants suite à une stimulation laryngée chez l'agneau nouveau-né à terme.

Les objectifs secondaires sont d'étudier :

- Si les résultats obtenus dépendent de la solution utilisée (eau distillée, acide chlorhydrique à pH 2, et sérum physiologique)
- Si les résultats obtenus dépendent des stades de conscience (sommeil calme, sommeil agité et éveil)

ARTICLES

Les objectifs de mon projet de doctorat sont illustrés dans deux articles, un portant sur l'influence de la prématurité et l'autre sur l'influence d'une exposition post-natale à la fumée secondaire.

Article 1

Marie St Hilaire, Nathalie Samson, Elise Nsegbe, Charles Duvareille, François Moreau-Bussière, Philippe Micheau, Johan Lebon, Jean-Paul Praud. ***Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb.*** J Appl Physiol 102: 1429-1438, 2007.

L'utilisation d'un modèle d'agneau prématuré est complexe et nécessite l'investissement de plusieurs personnes. Que ce soit pour la césarienne, la réanimation néonatale ou toute autre procédure nécessaire à la survie des agneaux prématurés, j'ai pris une part importante de ce travail. De plus, l'expérimentation, les analyses, la rédaction de l'article a été entièrement effectuée par moi. Ainsi, je suis fière d'affirmer que ma contribution aux résultats de cet article se situe à tous les niveaux, allant de la préparation du projet à l'écriture d'article.

Article 2

Marie St-Hilaire, Charles Duvareille, Olivier Avoine, Anne-Marie Carreau, Nathalie Samson, Philippe Micheau, Alexandre Doueik, Jean-Paul Praud.

Effects of post-natale smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. Soumis à J Appl Physiol.

L'utilisation d'un modèle d'exposition à la fumée secondaire est complexe surtout par le fait que l'exposition se déroulait sur une période de deux semaines. Ainsi, à chaque jour, pendant deux semaines, on devait venir s'occuper des agneaux et les exposer à la fumée secondaire. Ce projet, encore une fois, a nécessité l'investissement de plusieurs personnes. Par contre, j'ai pris une part importante de ce travail. De plus, tout comme l'article sur l'influence de la prématurité, l'expérimentation, les analyses, la rédaction de l'article ont été entièrement effectuées par moi. Ainsi, je suis fière d'affirmer que ma contribution aux résultats de cet article se situe à tous les niveaux, allant de la préparation du projet à l'écriture d'article.

Article 1

Marie St Hilaire, Nathalie Samson, Elise Nsegbe, Charles Duvareille, François Moreau-Bussière, Philippe Micheau, Johan Lebon, Jean-Paul Praud. ***Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb***. J Appl Physiol. 102: 1429-1438, 2007.

Les reflux laryngo-pharyngés acides, très fréquents en période néonatale, sont la remontée du contenu gastrique jusqu'au niveau du larynx. Le contact entre un liquide (ex : liquide gastrique acide) et le larynx déclenche chez un nouveau-né à terme et en santé des mécanismes de défense (toux, déglutition) appelés chémoréflexes laryngés, dont l'objectif est d'empêcher l'aspiration dans la trachée. Malheureusement, chez certains nouveau-nés, le contact entre le liquide et la muqueuse laryngée déclenche des réflexes délétères comprenant des arrêts de la respiration (apnées) et des battements cardiaques (bradycardies). Ces réflexes délétères sont impliqués dans les apnées du prématuré, les malaises graves du nourrisson et probablement dans certains cas de mort subite du nourrisson. Les observations cliniques suggèrent que certaines conditions néonatales, dont la prématurité, favorisent la survenue de ces réflexes délétères. Le but de ce projet est d'étudier les réponses cardio-respiratoires déclenchées en réponse à une solution acide chez l'agneau prématuré. Six agneaux prématurés sont nés par césarienne à 132 jours de gestation (terme = 147 jours). Deux jours après la naissance, une chirurgie a été effectuée afin d'installer des électrodes pour

l'enregistrement des stades de conscience et de l'activité électrique du muscle constricteur du larynx. De plus, un cathéter transcutané a été placé juste au-dessus du larynx pour l'injection du liquide. Sept jours et quatorze jours après la naissance, les chémoréflexes laryngés ont été induits par injection de 0.5 ml de sérum physiologique (contrôle négatif), d'eau distillée et HCl (pH 2) durant le sommeil calme, le sommeil agité ou l'éveil. Les résultats montrent qu'une stimulation laryngée, et ce peu importe la solution injectée, induit des réponses cardio-respiratoires plus importantes chez les agneaux prématurés (7 jours post-natal) que chez les agneaux à terme. De plus, le sérum physiologique, considéré comme contrôle négatif, déclenche des réflexes significatifs, illustrant l'hyperréflexivité laryngée associée à la prématurité. Quatorze jours après la naissance, les mêmes chémoréflexes laryngés induisent des réponses cardiorespiratoires moins importantes que la semaine précédente. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les chémoréflexes laryngés sont impliqués dans des épisodes d'apnées/bradycardie chez le nouveau-né prématuré, phénomène qui heureusement subit une maturation post-natale importante.

**POSTNATAL MATURATION OF LARYNGEAL CHEMOREFLEXES
IN THE PRETERM LAMB**

**Marie St Hilaire, Nathalie Samson, Elise Nsegbe, Charles Duvareille,
François Moreau-Bussière, Philippe Micheau, Johan Leblond, Jean-
Paul Praud**

From the Neonatal Respiratory Research Unit
Departments of Pediatrics and Physiology
University of Sherbrooke

Running title: Laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb

ABSTRACT

Laryngeal chemoreflexes (LCR) are triggered by the contact of liquids with the laryngeal mucosa. In a mature organism, LCR trigger lower airway protective responses (cough, effective swallowing and arousal) to prevent aspiration. General belief holds that LCR are responsible for apnea and bradycardia in the newborn mammal, including in humans. We have recently shown that LCR in full term lambs are consistently alike the mature LCR reported in adult mammals, without significant apneas and bradycardias (29). The aim of the present study was to assess LCR in nonsedated, newborn preterm lambs born at 132 days of gestation (term = 147 days). The preterm lambs were instrumented for recording glottal adductor EMG, EEG, eye movements, heart rate, systemic arterial pressure, respiration and oximetry. A chronic supra-glottal catheter was used for injecting 0.5 ml of saline, distilled water and HCl (pH 2) during quiet sleep, active sleep and wakefulness on postnatal day 7 (D7) and 14 (D14). Laryngeal stimulation by water or HCl on D7 induced significant apneas, bradycardia and desaturation, which at times appeared potentially life-threatening. Caffeine treatment significantly blunted those cardiorespiratory responses. No significant apneas, bradycardias or desaturation were observed on D14. No effects of sleep state could be shown. In conclusion, laryngeal stimulation by liquids triggers potentially dangerous LCR in preterm lambs on D7, but not on D14. We hypothesize

that post-natal maturation of the LCR between D7 and D14 is partly involved in the disappearance of apneas/bradycardias of prematurity with postnatal age.

INTRODUCTION

In a mature organism, stimulation of laryngeal mucosa receptors by liquids triggers highly protective reflexes (laryngeal chemoreflexes, LCR), which consist of coughing, arousal and effective swallowing to prevent subglottal aspiration. However, many animal experiments have led to the common belief that the LCR triggered in the newborn mammal are quite different and dominated by a vagal component, which includes laryngospasm, central or mixed/obstructive apnea, desaturation and bradycardia (31). Consequently, the LCR is felt to be partly responsible for apneas of prematurity, apparent life-threatening events and probably some cases of sudden infant death syndrome (4, 20, 31, 32, 34).

Although many previous studies have assessed the LCR in newborn mammals, most of them were performed in either anesthetized or sedated animals, and/or were aimed at stimulating the subglottal area. In a recent study, we showed that stimulation of the laryngeal mucosa with water or an acid solution (HCl and citric acid, pH 2) did not induce any significant decrease in heart rate or respiratory rate in nonsedated, full-term lambs during quiet sleep. However, significant lower airway protective responses (cough, swallowing and arousal) were observed following these stimulations, resembling the mature LCR reported in adult mammals (29). Accordingly, and in agreement with clinical observations that most healthy

newborns do not present with apnea/bradycardia from laryngeal stimulation, we hypothesized that the development of life-threatening LCR is linked to some predisposing neonatal condition, such as preterm birth (3, 16, 22, 23). The aim of the present study was to test this hypothesis by comprehensively assessing the LCR induced by different liquids (water, HCl and saline) throughout the various states of consciousness (quiet sleep, active sleep and wakefulness) in nonsedated, preterm lambs. In addition, we tested the hypotheses that caffeine pretreatment, or postnatal maturation to a postconceptional age equivalent to full term gestation, significantly blunted the cardiorespiratory components of the LCR. We believe that the demonstration that our hypotheses were true brings important knowledge for understanding severe pathological conditions commonly observed in preterm infants.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed in six preterm lambs with a postconceptional age of 131 to 134 days (normal gestation: 147 days) and a mean birth weight of 3.24 kgs (SD 0.61) (range: 2.58 - 4 kg). The protocol of the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of our institution.

Preterm lamb model

Six preterm lambs were delivered by cesarean section under epidural anesthesia with 5 ml of 2% lidocaine. The ewes received an intramuscular injection of betamethasone (0.5 mg/kg) 48h before surgery. Immediately after birth, the lambs were intubated and exogenous surfactant (10 ml of BLES, London, ON) was given by intratracheal injection (same dose repeated 24 h later). Intermittent positive pressure ventilation (12/6 cm H₂O) was then administered through the endotracheal tube, using a Neopuff-Infant Resuscitator (Fisher-Paykel, Laguna Hill, CA) during 30 seconds or until initiation of spontaneous breathing. Standard care during the first 24h of life systematically included continuous positive airway pressure through the endotracheal tube (6 cm H₂O, Siemens Servo 300) for 24h (first three preterm lambs) or 6h (latter three lambs), with supplemental oxygen as needed to maintain transcutaneous oxygen saturation > 95%

(SpO₂, Radical, Masimo, Irvine, CA). In addition, the lambs were placed in an incubator for at least 24h to maintain rectal temperature > 38.5°C, and received dextrose intravenous supplementation to maintain glycemia > 2.3mmol/l. Continuous nasogastric feeding with natural ewe's milk was started at 24 h of life and stopped for surgery (see below). Following surgery, all lambs received supplemental oxygen as needed to maintain SpO₂ > 95%. Discontinuous nasogastric, then oral, feeding was initiated 24 h after surgery. Caffeine (one dose of 10 mg/kg subcutaneously) and/or doxapram (1 mg/kg intravenously, repeated when needed) were used as needed to treat severe, life-threatening apneas beginning 12-24h after birth.

Instrumentation of the lambs and recording equipment

Surgery was performed on the third day of life (3-4 days before the first recording) under general anesthesia (2% isoflurane, 30% N₂O, and 68% O₂). Atropine sulfate (0.1 mg/kg), ketamine (5 mg/kg), and ketoprofen (3 mg/kg) were injected intramuscularly before anesthesia, while 10 ml/kg lactate Ringer was infused intravenously throughout the surgical procedure. Following an IV loading dose of 25 µg/kg, morphine was infused (2 µg/kg/h) throughout surgery and for the next 18h. Antibiotics (50 mg/kg ampicillin and 2.5 mg/kg gentamicin) were also injected intramuscularly before anesthesia and once a day throughout the study. Bipolar, gold plated stainless steel electrodes were inserted into the

thyroarytenoid (TA, a glottal adductor) through the lateral aspect of the thyroid cartilage for recording TA electrical activity (TA EMG). The electrode was then glued on the external surface of the thyroid cartilage. One bipolar electrode was usually placed in each TA muscle to ensure that at least one TA could be recorded in case of electrode damage. In three preterm lambs, a bipolar electrode was also inserted into the diaphragm for recording EMG, using an established technique (11). Two right-angled, platinum needle-electrodes (E7-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) were inserted into the parietal cortex directly through the skull, at the level of the lambda suture, 1 cm from the midline, for electroencephalogram (EEG) recording. A platinum needle-electrode (E2-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) was also inserted under the scalp as a ground. Two platinum needle-electrodes (E2-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) were inserted subcutaneously on the proximal forelegs for recording electrocardiogram (ECG). Leads from all electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back of the lambs. Correct positioning of the electrodes in the TA and diaphragmatic muscles was systematically verified at autopsy. In addition, a supraglottal catheter was inserted transcutaneously to allow injection of liquids onto the larynx. The catheter was adapted from an infusion catheter and positioned such as its tip was 5-7.5 mm above the anterior part of the glottis. A plastic tubing (internal diameter 1 mm) was subcutaneously tunneled in the neck of the lamb, and connected to the external part of the catheter, which

protruded 15-20 mm at the level of the anterosuperior aspect of the thyroid cartilage (5). Correct catheter positioning above the glottis was monitored throughout the insertion procedure by direct laryngoscopy and was systematically confirmed during autopsy. Finally, an arterial catheter was inserted into the brachial artery for recording systemic arterial pressure.

Lamb's instrumentation was completed immediately before the recordings in nonsedated lambs. Nasal airflow was recorded by use of a thermocouple wire (iron/constantan, type J; Omega Engineering, Stamford, (CT) glued to the side of one nostril. Two platinum needle electrodes (E2-12, Grass Instruments Company, Quincy, MA) were placed subcutaneously into the outer upper region and the inner lower region of the right eye socket for electrooculogram (EOG) recording. Thoracic and abdominal elastic bands were placed for recording respiratory inductance plethysmography. An oximeter probe (8000R reflectance sensor, Nonin Medical, Plymouth, MN) was attached at the base of the tail for continuous monitoring of SpO₂. Finally, the subcutaneous plastic tubing connected to the supraglottal catheter was attached to a custom-designed, radiotelemetry-driven injector, where the liquid to be injected was warmed and maintained at the lamb's body temperature.

Leads from the EMG, EOG, EEG, and ECG electrodes and the nasal thermocouple were connected to a transmitter attached to the lamb's back

just before the experiment. Raw EMG, EOG, EEG and ECG signals and the nasal flow were transmitted by a custom-designed radiotelemetry equipment (13). The raw EMG signals were moving time averaged (100 ms). Oxygenation was continuously monitored via a custom-designed pulse oximeter (SpO₂) built from a Nonin OEM with transmission by radiotelemetry (27). Thoracic and abdominal volume variations were qualitatively assessed, using the Resptrace equipment (NIMS, Miami Beach, FL). Systemic arterial pressure was obtained from the brachial catheter using a pressure transducer (Trantec model 60-800, American Edwards Laboratories, Santa Anna, CA) and pressure monitor (model 78342A Hewlett-Packard, Waltham, MA). All parameters were continuously recorded using acquisition software (Acknowledge Version 3.2, Biopac System, Santa Barbara, CA). Collected data were stored on compact disk for further analysis.

Design of the study

The study was designed to allow for simultaneous recording of TA and diaphragmatic EMG, ECG, EEG, EOG, nasal flow, sum of thoracic and abdominal movements, SpO₂ and systemic arterial pressure while triggering laryngeal chemoreflexes (LCR) by injection of liquids. Lambs were fed *ad libitum* with ewe's milk at 8:00 am, 1:00, 6:00 and 10:00 pm and thrived normally. Lambs were comfortably positioned on a mattress without contention. Ambient temperature was kept at 22°C and humidity at

70% throughout the experimental days. Recordings were performed in non sedated lambs on postnatal day 7 or 8, and repeated on postnatal day 14 or 15. Each experimental day consisted of a random sequence of 0.5 ml injections *via* the supraglottal catheter of saline (0.9% NaCl, pH = 5.5), distilled water (pH = 5.7) and hydrochloric acid (HCl) diluted in saline (pH = 2). All three solutions were injected once in wakefulness, quiet sleep and active sleep (total of 9 injections on each experimental day). In addition, the catheter was systematically flushed with 1 ml of saline between each injection of test solutions (dead space of the catheter 0.5ml). Each animal was given at least 15 min of recovery time between two injections. Events such as agitation, cough, and arousal or full awakening were noted by an observer throughout the recording sessions.

Data analysis

The main objectives of the study were 1) to assess the characteristics of the LCR elicited by different solutions (HCl, distilled water, and saline); 2) to assess the effect of the states of consciousness on the LCR; 3) to assess the effect of postnatal maturation in nonsedated preterm lambs. In addition, as 3 lambs needed to be treated with caffeine for life-threatening apneas, results obtained in lambs treated with caffeine were compared to results in untreated lambs. Analysis of the LCR was performed as described previously (29). First, the cardio-respiratory responses to each laryngeal injection were assessed as follows. The percentage of decrease

in heart rate [$\%dec\ HR = (HR_{BL} - HR_{min}) * 100 / HR_{BL}$] was calculated with HR_{BL} representing the baseline heart rate (HR) value averaged over 1 min before challenge and HR_{min} the minimal HR value observed during the first min after the challenge. Moreover, any presence of bradycardia was noted, as defined by a $\%dec\ HR$ greater than 30%, as well as the number of bradycardias and total summed duration of bradycardias. The percentage of decrease in respiratory rate [$\%dec\ RR = (RR_{BL} - RR_{min}) * 100 / RR_{BL}$] was also calculated, with RR_{BL} representing the baseline respiratory rate (RR) averaged 1 min before challenge, and RR_{min} the minimal RR value observed during the first min after challenge. The time durations between the moment of injection and the moment of HR_{min} , and RR_{min} occurrence (respectively HR_{min} , and RR_{min} occurrence times) were measured for all stimulations. The presence of apneas (defined as at least 2 missed breaths, as referred to baseline breathing) was assessed within 1 min after laryngeal stimulation. The number of apneas and the total summed duration of apneas were noted. Moreover, presence of any apneas longer than 5 s, 10 s, 20 s and 30 s was also noted. The respiratory LCR duration was measured as the time duration between the onset of the LCR and resumption of 3 consecutive breaths (33). Moreover, any presence of desaturation was noted, as defined by a decrease in SpO_2 of at least 4% or below 90%. Aside from the cardio-respiratory responses, the number of swallows (defined as a brisk, high-amplitude and short-duration TA EMG burst) (25) occurring within 1 min interval after laryngeal stimulation was

counted. The time duration between the stimulation and the first swallow, and the time duration between the first and last swallow (total swallowing duration) were measured. In addition, total summed duration of TA EMG (total TA EMG duration) was calculated within 1 min after laryngeal stimulation for each stimulus. The presence of coughing was also noted (number of lambs which coughed / total number of lambs). Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define wakefulness (W), quiet sleep (QS), and active sleep (AS) from EEG, EOG, and continuous visual observation (28). Cortical arousal from QS was defined by the association of a change in EEG (decrease in amplitude + increase in frequency) for 3 s or more, with at least two of the following modifications: a 10% increase in HR or change in RR, or a movement (10). Arousal from AS was recognized by direct observation of the lamb and disappearance of intense EOG activity. Full awakening was defined when the lamb was still awake after 1 min (7). The number of stimulations with arousal or full awakening was noted.

Statistical analysis

Measurements were averaged for the 6 preterm lambs as a whole. Values were then expressed as means \pm SD. Statistical analyses were performed using SAS (version 8.2, SAS Institute, Cary, NC). The generalized estimating equations (GENMOD procedure) were used to estimate the effects of solution, state of alertness and postnatal day on all parameters.

All the response variables failed the Shapiro-Wilks test of normality. The variables were then modeled as Poisson data. The working correlation structure chosen was of the exchangeable type to account for the correlation among the repeated measurements within lambs. For all parameters, a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 54 laryngeal stimulations (6 saline, 6 distilled water and 6 HCl in each state of alertness) were performed on post-natal day 7 and 45 stimulations (5 saline, 5 distilled water and 5 HCl in each state of alertness) on post-natal day 14.

Laryngeal chemoreflexes in quiet sleep, on post-natal day 7

All results obtained on post-natal day 7 and during quiet sleep are detailed in table 1. Following laryngeal stimulation, all solutions, including saline, induced apneas and swallows within 3 seconds. While HR_{min} tended to be delayed compared with RR_{min} , the difference was not statistically significant. Saline consistently induced apnea(s), swallowing and TA EMG activity. Moreover, saline injection elicited a mean %dec HR of 27% (SD 16), including even a few bradycardias and a %inc MAP of 17% (SD 7). However, cough was absent and arousal a rare occurrence. Distilled water elicited greater cardiorespiratory responses than saline, including for %dec HR (41%, $p < 0.0001$ vs. saline) and bradycardia duration (20 sec (SD 28), $p < 0.0001$ vs. saline), and for %dec RR (83%, $p = 0.01$ vs. saline), number of apneas (4.5 apneas, $p = 0.05$), apnea duration (20 sec, $p = 0.01$) and respiratory LCR duration (26 sec, $p < 0.001$). In addition, the number of swallows ($p = 0.007$) and total TA EMG duration ($p = 0.002$) were greater following water. A weak cough was observed 9 seconds after one injection

of distilled water only. Arousal occurred in 3/6 lambs following water ($p = 0.1$ vs. saline), and full awakening was observed only in 1/6 lamb. Hydrochloric acid elicited cardiorespiratory responses of intermediate amplitude between saline and water, including for %dec HR (35%, $p = 0.2$ vs. saline and $p = 0.6$ vs. water), bradycardia duration (10.5 sec, $p = 0.9$ vs. saline and $p = 0.04$ vs. water), %RR (71%, $p = 0.6$ vs. saline and $p = 0.1$ vs. water), the number of apneas (2.2 apneas, $p = 0.9$ vs. saline and $p = 0.1$ vs. water), apnea duration (17.5 sec, $p = 0.2$ vs. saline and $p = 0.8$ vs. water). Respiratory LCR duration following HCl injection was significantly longer than after saline ($p = 0.002$), and identical to the one after water ($p = 0.5$). Hydrochloric acid induced significantly more swallows than saline ($p < 0.001$) and water ($p = 0.0002$). Total TA EMG duration was longer than after saline ($p = 0.002$), and identical to the one following water ($p = 0.9$). Weak coughing, occurring 20 sec after HCl injection, was observed more often than after saline ($p = 0.03$), but not than after water ($p = 0.3$). Finally, while HCl induced arousal significantly more often than saline ($p = 0.001$), the difference was not significant between HCl and water ($p = 0.07$). Also, the increasing trend for full awakening with HCl was not significant.

Table 1
Laryngeal chemoreflexes developing in response to various stimuli in quiet sleep on postnatal days 7 and 14

	Saline		Distilled water		Hydrochloric acid	
	7	14	7	14	7	14
% dec HR	27.4 (SD 16)	12.1 (SD 4) ^a	40.8 (SD 33) ^a	33.7 (SD 17) ^d	34.9 (SD 14)	28.5 (SD 11) ^{cd}
Number of bradycardias	2.2 (SD 5)	0 (SD 0)	2.8 (SD 4)	0.8 (SD 0.9)	2.7 (SD 3)	1.8 (SD 4)
Bradycardia duration, s	2.1 (SD 5)	0 (SD 0)	20 (SD 28) ^a	0.4 (SD 0.44) ^b	10.5 (SD 22) ^b	1.3 (SD 2.9) ^e
HR _{min} occurrence time, s	14 (SD 13)	9.2 (SD 12)	16.7 (SD 9)	6.7 (SD 2) ^b	18.7 (SD 13)	22.9 (SD 14) ^e
% inc MAP	17 (SD 7)	NA	NA	NA	NA	NA
% dec RR	66 (SD 15)	44 (SD 17) ^a	83 (SD 10) ^a	64 (SD 11) ^{bd}	71.3 (SD 20)	64.7 (SD 22) ^d
Number of apneas	2.2 (SD 0.8)	0.6 (SD 1)	4.5 (SD 4) ^a	2.2 (SD 2) ^{bd}	2.2 (SD 2)	2.2 (SD 3) ^d
Apnea duration, s	7.2 (SD 7)	1.5 (SD 3) ^a	20 (SD 15) ^a	7.8 (SD 5) ^{db}	17.5 (SD 22)	9.9 (SD 15) ^{de}
RR _{min} occurrence time, s	7.7 (SD 4)	9 (SD 13)	3.8 (SD 7)	2.1 (SD 4) ^d	10.7 (SD 11)	24.7 (SD 20) ^{de}
Respiratory LCR duration, s	9.9 (SD 5)	8 (SD 7)	26 (SD 15) ^a	10 (SD 3) ^b	31.3 (SD 2) ^a	8.4 (SD 3.72) ^c
Number of swallows	2 (SD 2)	NA	4.2 (SD 3) ^a	NA	6 (SD 4) ^{ab}	NA
Total TA EMG duration	4.6 (SD 6)	NA	6.7 (SD 8) ^a	NA	6.7 (SD 7)	NA
Cough (number of lambs with cough/ total number of lambs)	0/6	1/5	1/6	1/5	3/6 ^a	2/5
Arousal (number of lambs with arousal/ total number of lambs)	1/6	3/5	3/6	4/5	5/6 ^a	4/5
Awakening (number of lambs with awakening/ total number of lambs)	0/6	1/5	1/6	3/5	4/6	1/5

Values are given as mean (standard deviation). LCR: laryngeal chemoreflexes. HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; RR: respiratory rate. HR_{min} and RR_{min} occurrence time: time duration from injection to minimal HR or RR value. %dec HR and RR: percentage decrease in HR or RR; %inc MAP: percentage increase in MAP. Total TA EMG: total duration of electrical activity of the thyroarytenoid muscle. NA: not available. ^a p < 0.05 vs saline D7; ^b p < 0.05 vs distilled water D7; ^c p < 0.05 vs hydrochloric acid D7; ^d p < 0.05 vs saline D14; ^e p < 0.05 vs distilled water D14.

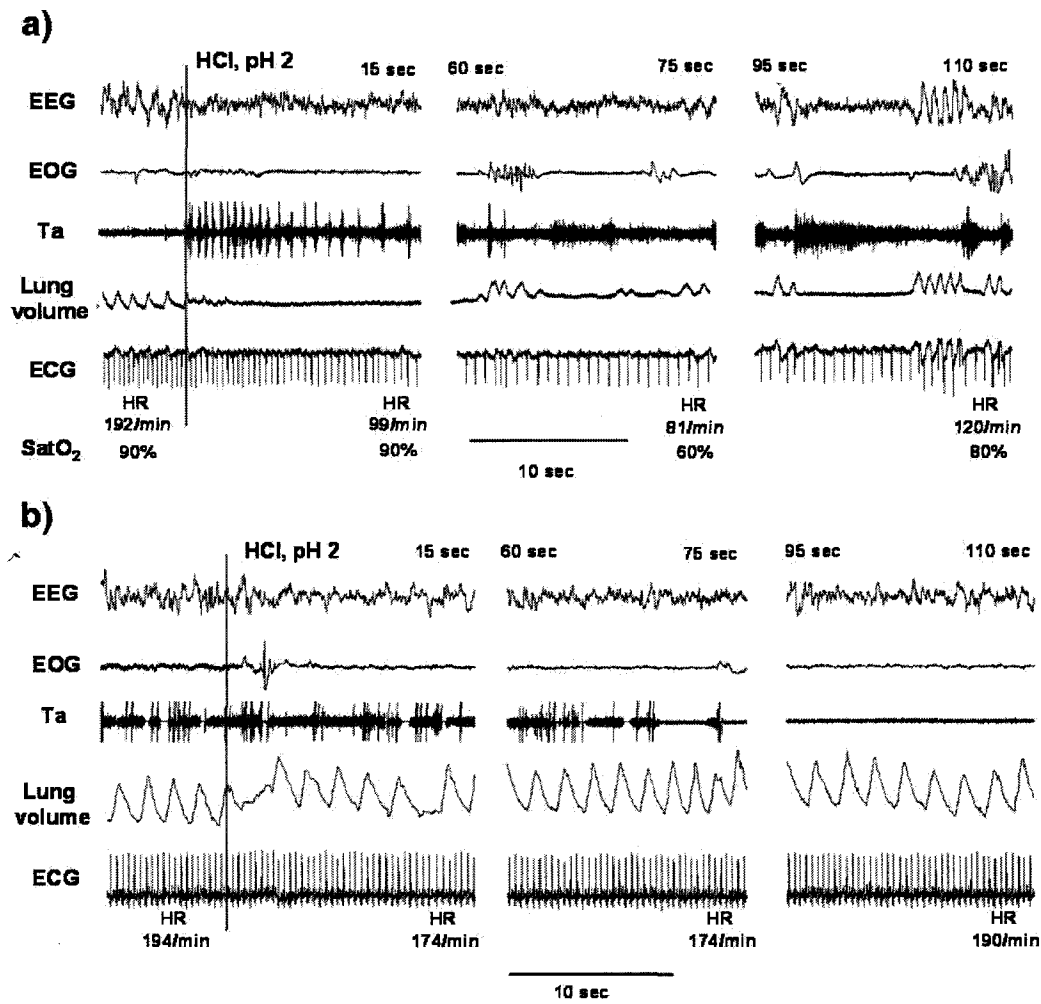
Detailed results on apnea and bradycardia duration observed in QS are shown in table 2. While apneas longer than 5 sec were observed with all three solutions in QS, apneas longer than 20 sec were observed only after distilled water and hydrochloric acid. Potentially life-threatening cardiorespiratory reflexes were triggered in two preterm lambs following distilled water and hydrochloric acid, including apneas longer than 20 sec with bradycardia longer than 20 sec and decrease in SpO₂ ranging from 13 to 36% (figure 1).

Table 2
Apnea and bradycardia duration for each stimulus on postnatal days 7 (D7) and 14 (D14) in quiet sleep

	Saline		Distilled water		Hydrochloric acid	
	D7	D14	D7	D14	D7	D14
> 20 sec	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1	0/0
10 to 19 sec	1/0	0/0	2/1	0/0	1/1	1/0
5 to 9 sec	2/0	0/0	5/3	4/0	2/0	3/0
< 5 sec	10/13	3/0	19/9	5/3	7/11	7/9

Values are number of apneas/number of bradycardias

Figure 1

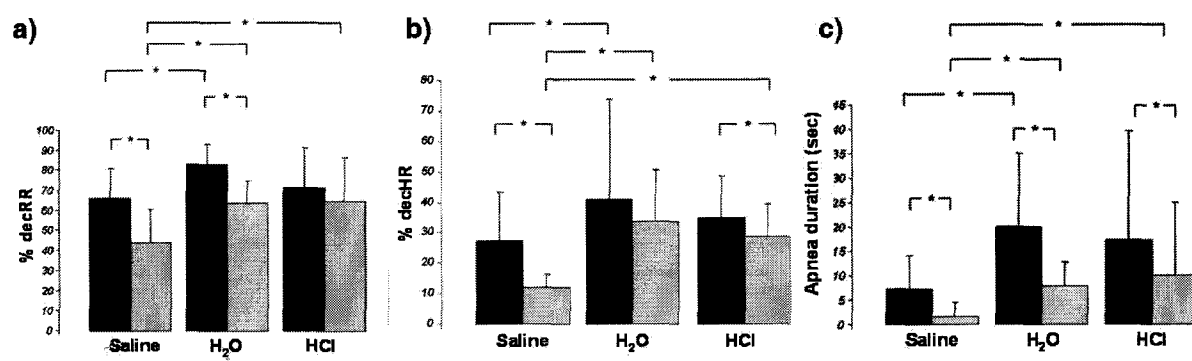


- a) Potentially life-threatening cardiorespiratory reflexes triggered in preterm lambs at post-natal day 7, following instillation of 0.5 ml hydrochloric acid onto the laryngeal mucosa during quiet sleep. The same pattern was observed following distilled water injection. From top to bottom: EEG, electroencephalogram; EOG, electrooculogram; Ta, electrical activity of the thyroarytenoid muscle; lung volume, sum signal of the respiratory inductance plethysmograph, allowing qualitative measurement of respiration (inspiration upward); ECG, electrocardiogram; HR, heart rate (beats/min); SpO₂, oxygen hemoglobin saturation measured by pulse oximetry. Note the prolonged, potentially life-threatening responses with repetitive apneas, bradycardia and desaturation.
- b) Laryngeal chemoreflexes in response to instillation of 0.5 ml hydrochloric acid onto laryngeal mucosa at post-natal day 14 during quiet sleep (same lamb as in figure 1a).

Laryngeal chemoreflexes in quiet sleep on post-natal day 14

A clear maturation of the laryngeal chemoreflexes was observed from post-natal day 7 to 14 (table 1, figure 1, figure 2). Following saline injection on D14, no bradycardias and almost no apneas were observed, and the decrease in HR and RR was significantly smaller ($p = 0.02$ vs. D7 for both HR and RR). While not significant, cough and arousal tended to be more frequent on D14 compared to D7 (cough: $p = 0.2$ vs. D7, arousal; $p = 0.1$ vs. D7). Following distilled water on D14, bradycardia duration was shorter ($p < 0.001$ vs. D7), and the decrease in RR ($p = 0.001$ vs. D7), the number of apneas ($p = 0.0005$ vs. D7), and the apnea duration and respiratory LCR duration ($p < 0.001$ and $p = 0.006$ vs. D7, respectively) were all less marked than on D7. Following hydrochloric acid, both the decrease in HR and the respiratory LCR duration ($p < 0.001$ vs. D7) were significantly less marked ($p = 0.004$ vs. D7). In addition, detailed analysis of the duration of the apneas and bradycardias (table 2) showed that, contrarily to observations on D7, saline induced only apneas shorter than 5 sec and no bradycardia, and distilled water and hydrochloric acid elicited apneas shorter than 20 sec and bradycardias shorter than 5 sec. Finally, on D14, no potentially dangerous cardiorespiratory reflexes were elicited in preterm lambs.

Figure 2



Effect of postnatal maturation on the percentage of decrease in respiratory rate (% decRR, figure 2a), decrease in heart rate (% decHR, figure 2b) and apnea duration (figure 2c) from postnatal day 7 (black boxes) to postnatal day 14 (grey boxes) in preterm lambs following instillation of 0.5 ml saline, distilled water and hydrochloric acid onto the laryngeal mucosa during quiet sleep. Values are given as mean \pm standard deviation. * = $p < 0.05$

Effects of sleep states on the laryngeal chemoreflexes on postnatal day 7

Results are presented in table 3. On postnatal day 7, no major or clear effects of sleep states were observed for all solutions. The responses were very variable from one state to the other, depending on the responses analyzed and the solution used. While we were unable to sort out a specific pattern for each state of alertness, the following trends were observed. The cardiorespiratory responses to saline injection appeared identical in QS and AS, but weaker in W. On the contrary, the cardiorespiratory responses to water were greater in QS than in both W and AS. Finally, the cardiorespiratory responses to HCl were very variable, with a trend to be weaker in QS than in both W and AS.

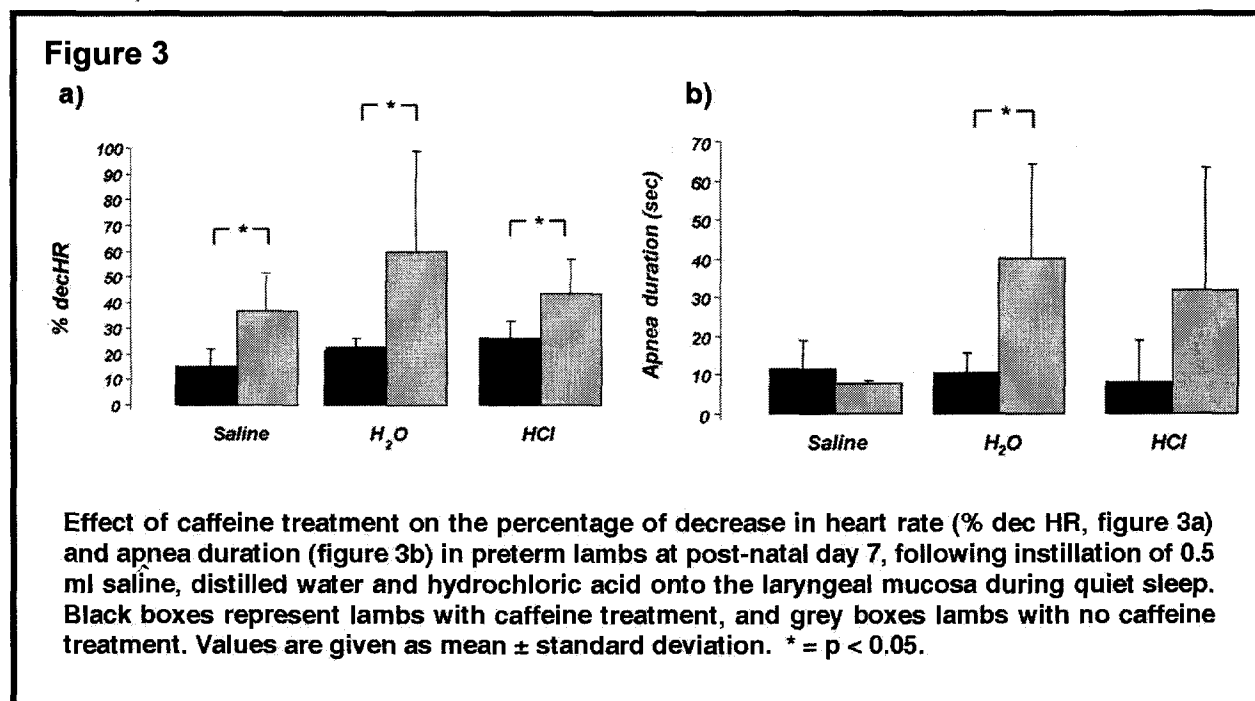
Table 3
Laryngeal chemoreflexes developing in response to various stimuli for each state of alertness on postnatal day 7

	Saline			Distilled water			Hydrochloric acid		
	QS	AS	W	QS	AS	W	QS	AS	W
% dec HR	27.44 (SD 16)	24.8 (SD 11)	16.9 (SD 6) ^{ab}	40.8 (SD 33) ^a	29.7 (SD 13)	31.8 (SD 21) ^{cf}	34.85 (SD 14)	33.11 (SD 15) ^b	42.2 (SD 22) ^{def}
Number of bradycardias	2.17 (SD 5)	0.8 (SD 1)	0 (SD 0)	2.8 (SD 4)	2.4 (SD 4) ^b	3.4 (SD 5)	2.7 (SD 3)	4 (SD 6) ^b	3 (SD 3)
Bradycardia duration, s	2.0(6 (SD 5)	0.9 (SD 2) ^a	0 (SD 0)	20 (SD 28) ^a	2.61 (SD 6) ^{cb}	7 (SD 10) ^{cg}	10.54 (SD 22) ^c	4.2 (SD 7) ^b	12.7 (SD 23) ^h
% inc MAP	17 (SD 7)	13 (SD 9)	14 (SD 6)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
% dec RR	66 (SD 15)	77.9 (SD 16)	57.9 (SD 13) ^b	83 (SD 10) ^a	73.5 (SD 9) ^c	72.8 (SD 12) ^c	71.3 (SD 20)	84 (SD 11) ^{dbg}	76.7 (SD 18)
Number of apneas	2.17 (SD 0.8)	7.2 (SD 9) ^a	0.7 (SD 0.8) ^{ab}	4.5 (SD 4) ^a	2.6 (SD 1.2) ^c	3.4 (SD 2.4) ^f	2.2 (SD 2)	7.33 (SD 6) ^{gd}	4.5 (SD 3.3) ^{fd}
Apnea duration, s	7.23 (SD 7)	15.1 (SD 19)	2.34 (SD 3.7) ^b	20 (SD 15) ^a	8.5 (SD 4) ^c	12.4 (SD 10) ^{cf}	17.5 (SD 22)	27.4 (SD 20) ^{bg}	23.4 (SD 27) ^{df}
Respiratory LCR duration, s	9.92 (SD 5)	14.6 (SD 8)	9.33 (SD 6) ^b	26 (SD 15) ^a	12.8 (SD 14) ^c	14.4 (SD 8) ^c	31.3 (SD 2) ^a	23 (SD 13) ^{db}	32.4 (SD 38) ^{fh}
Number of swallows	2 (SD 2)	4 (SD 2)	1.4 (SD 2) ^b	4.2 (SD 3) ^a	3.8 (SD 3)	3.8 (SD 4) ^f	6 (SD 4) ^{ac}	5.2 (SD 3.4)	5.3 (SD 4) ^f
Total TA EMG duration	4.6 (SD 6)	3.63 (SD 5)	1.9 (SD 2) ^{ab}	6.7 (SD 8) ^a	4.7 (SD 6)	3(SD 2) ^{cf}	6.7 (SD 7)	8.56 (SD 8.6) ^b	8.1 (SD 5) ^f
Cough (number of lambs with cough/ total number of lambs)	0/6	0/6	1/6	1/6	0/6	1/6	3/6 ^a	2/6	4/6 ^{fh}
Arousal (number of lambs with arousal/ total number of lambs)	1/6	2/6	NA	3/6	0/6 ^c	NA	5/6 ^a	5/6 ^g	NA
Awakening (number of lambs with awakening/ total number of lambs)	0/6	0/6	NA	1/6	0/6	NA	4/5	0/6	NA

Values are given as mean (standard deviation). See table 1 for abbreviations. ^a p < 0.05 vs saline QS; ^b p < 0.05 vs saline AS; ^c p < distilled water QS; ^d p < 0.05 vs HCl QS; ^e p < 0.05 vs HCl AS; ^f p < 0.05 vs saline W; ^g p < 0.05 vs distilled water AS; ^h p < 0.05 vs distilled water W.

Effects of previous caffeine treatment on the laryngeal chemoreflexes

Three out of six preterm lambs received caffeine treatment in the first three days of life for life-threatening apneas of prematurity. Even though the treatment was ceased at least three days before experimentation, caffeine plasmatic level was still measured at 5, 7 et 7 mg/ml on D7 in those three lambs. Following caffeine treatment (figure 3), apnea duration ($p < 0.0001$) and % dec HR ($p = 0.002$) were less marked following distilled water. Similarly, % dec HR ($p = 0.01$) was less marked following hydrochloric acid. Finally, no potentially dangerous cardiorespiratory reflexes were elicited in the three lambs treated with caffeine.



DISCUSSION

The present study brings unique findings on the laryngeal chemoreflexes observed in preterm lambs following injection of various liquids, including the effect of early postnatal maturation and the effect of caffeine treatment. Overall, laryngeal stimulation by liquids in nonsedated, non tracheostomized preterm lambs on post-natal day 7 (D7) induces clinically significant apneas, bradycardias and desaturations, which can even be life-threatening in some cases. In addition, our results show that a significant postnatal maturation of the LCR takes place in lambs born 2 weeks prematurely, so that the LCR observed on D14 are much less marked than on D7. Also, caffeine significantly blunted the LCR on D7. Finally, no clear effect of the states of alertness could be shown in the present study.

Laryngeal chemoreflexes in preterm lambs in quiet sleep at postnatal day 7

Extensive review of the literature reveals only one study on LCR in preterm newborn mammals (16). Distilled water injected through a tracheostomy in QS and AS around 10 days of life in preterm lambs born at 130 -135 days of gestation was shown to elicit apnea, bradycardia and hypertension. The percent of decrease in respiratory and heart rate observed in QS in that previous study, when no arousal occurred, was similar to our present observations on D7. In addition, though not recorded in all lambs for

technical reasons, we observed a greater increase in mean arterial pressure than previously in full-term lambs. Results of the present study thus confirm that exaggerated LCR can be elicited in preterm lambs, as compared to term lambs (29). The present results obtained in lambs with intact airways, including life-threatening apneas on a few occasions, are in agreement with the prolonged cardiorespiratory responses previously reported in preterm, tracheostomized lambs in QS after water injection, including one lamb which failed to recover 45 sec after the stimulation and required resuscitation (16). Design of the present study does not allow us to infer the cause(s) of the exaggerated laryngeal chemoreflexes observed in preterm lambs, as compared to full-term lambs. Immaturity of the cardiorespiratory “controllers”, increased laryngeal receptor sensitivity and/or subglottal aspiration with stimulation of tracheal receptors may all be involved in preterm lambs to explain the differences with full-term lambs.

Besides cardiorespiratory responses, laryngeal stimulation with liquids also elicits cough, swallowing and arousal. These components of the LCR are believed to be protective mechanisms aiming both at clearing liquids more rapidly from the laryngeal region, and at preventing tracheal aspiration, which could lead to more dramatic cardiorespiratory events in the newborn. Those reflex responses were observed in full-term lambs during QS following water and HCl stimulation (29). In the present study, the few coughing responses observed in QS, especially following HCl, were

different than the ones we previously recorded immediately after liquid injection in full-term lambs: indeed, cough was weaker, delayed (9 to 20 sec after the stimulation), and occurred during central apnea in preterm lambs. Accordingly, cough has been rarely observed after pharyngeal infusion of water (4% of the stimulations) in preterm human infants, and generally occurred during a central apnea. Overall, cough in preterm newborn mammals is not considered to be an adequate strategy for clearing liquids from the laryngeal mucosa (3, 31). Repeated swallows were also observed in preterm lambs in the present study, as well as in preterm human infants previously (3, 24, 25). In addition, swallows appeared more frequent than in full-term lambs (24, 29). An increase in bursts of non-nutritive swallowing occurring spontaneously has been reported previously in preterm infants and preterm lambs, regardless of the state of alertness (20, 24, 26). While the latter data have led to the speculation that preterm birth leads to an increase in pharyngo-laryngeal sensitivity, the physiological consequences of these repeated swallows still remain to be proven, some authors considering them as ineffectual (24). Theoretically, arousal could play a critical role following laryngeal stimulation, especially by promoting more effective coughing and swallowing reflexes and cessation of apnea and bradycardia. While previous studies reported that arousal can be present in preterm lambs (16) and in preterm human infants (3), the present results suggest that arousal from QS tends to be less frequent in preterm lambs than full-term

lambs following saline or water injection (29). In addition, while some stimulations induced full awakening from QS, especially following HCl, no stimulation in AS induced full awakening, which may be less than ideal in conditions such as gastrolaryngeal reflux.

Results in QS on D7 in preterm lambs showing a tendency towards lower amplitude of the cardiorespiratory reflexes following HCl than water, together with a consistent tendency towards more coughing and arousal, suggest that the latter reflexes offer at least a partial protective mechanism against HCl. In addition, the identical total duration of TA EMG, a marker of glottal closure, following water and HCl, suggests that the tendency towards greater cardiorespiratory reflexes with water vs. HCl does not originate from subglottal aspiration with stimulation of tracheal receptors. While the reasons for differences in the amplitude of the cardiorespiratory responses between water and HCl remain unknown, they are likely related to stimulation of different laryngeal receptors, as suggested by our recent observations in newborn lambs of laryngeal receptors known to be specifically stimulated by extracellular protons, including TRPV-1, ASIC-1 and TASK-1 receptors (unpublished observations). However, it is noteworthy that despite the fact that HCl tended on average to induce weaker cardiorespiratory responses than water, both HCl and water at times induced potentially life-threatening responses.

Laryngeal chemoreflexes induced by saline in preterm lambs

Previous studies in newborn animals have shown minimal cardiorespiratory responses to the injection of saline on the laryngeal mucosa, and saline rinse has been used to inhibit responses to the injection of liquids such as water, sodium bicarbonate or acids (8, 15, 30). Accordingly, we have recently shown that saline induces virtually no responses in full-term lambs during QS (29). However, pharyngeal instillation of saline induced prolonged apneas in human preterm infants with apneas of prematurity (22, 23), though the apneas were more marked following water injection (3). In the present study, saline on D7 induced significant cardiorespiratory responses in preterm lambs, including clinically significant apneas and short bradycardias on a few occasions. The presence of cardiorespiratory responses to a bolus injection of saline onto the larynx may be related to stimulation of flow or pressure laryngeal mechanoreceptors (3, 30). Whatever the mechanism(s) involved, our present results confirm that premature birth is responsible for a laryngeal hyperreflectivity to all studied liquids, including saline, and show that this hyperreflectivity includes both the apneic and the bradycardic component of the LCR.

Early postnatal maturation of the laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb

It is generally accepted that the laryngeal chemoreflexes undergo a postnatal maturation from neonatal to adult life, the prolonged apneas, bradycardias and bursts of swallows repeatedly reported in newborn mammals being replaced by cough and arousal at adult age (see review in 31). However, studies of postnatal maturation of the LCR in the first weeks of life have yielded inconsistent results, which may be due to differences in species maturation or experimental conditions. Indeed, while severity of the apnea induced by laryngeal stimulation decreased during the first week of life in puppies in one study (2), another study reported that it first increased from the first to the third postnatal weeks in puppies, and decreased thereafter (21). In addition, other studies have shown that the apneic responses following laryngeal stimulation are minimal in piglets older than 50 days, as compared to piglets younger than 15 days (6, 12). Results of the present study further show that the exaggerated cardiorespiratory responses observed in preterm lambs on D7 are significantly decreased on D14, with no life-threatening responses observed at that age. Overall, the reflexes observed on D14 were similar to the reflexes observed in term lambs on D4 (29). Not amazingly, the two lambs, which had potentially life-threatening reflexes on D7 in response to water and HCl, still had the most important reflexes on D14. These results are in agreement and further previous studies performed in preterm and

full-term human infants, which showed much more prolonged responses with repetitive swallows, apnea and laryngeal closure in preterm (3, 23, 24) than full-term infants (24).

Effects of caffeine treatment on the laryngeal chemoreflexes

Xanthine derivatives such as caffeine or theophylline are widely used for treating apneas of prematurity (1). The effects of xanthines, which are potent adenosine receptor blocking agents, include an increase in minute ventilation and in CO₂ sensitivity, a decrease in hypoxic depression and periodic breathing (18). Apneas induced by injection of milk or water onto the larynx were shown to be shortened following administration of aminophylline in piglets (12). The significant blunting effect of caffeine on the LCR induced by saline, water and HCl injection observed in the present study extends those previous results to the bradycardic component of the LCR and to a newborn mammal born prematurely. These new data are especially relevant to the management of apneas of prematurity observed in the neonatal intensive care unit. In addition, the present results show that the effects of caffeine are not related to its well-known stimulating effect on wakefulness, for they were especially observed in QS.

Clinical Implications

Apneas of prematurity are usually defined for clinical purpose by a cessation of breathing accompanied with bradycardia and/or hemoglobin

oxygen desaturation (17). Both clinical experience and results from a few studies in preterm human infants strongly suggest that LCR are one of the mechanisms involved in apneas of prematurity (see review in 32). Besides feeding and the administration of oral medications such as polyvitamins or ranitidine, endogenous stimuli such as gastro-laryngeal refluxes and upper airway secretions can trigger LCR in preterm infants (19, 32). Regarding the relevance of acid-triggered LCR, the preterm infant has been shown to have the capacity to maintain gastric pH below 4 (9), and a recent study confirmed that between feedings, 25% of gastric refluxes are acid in healthy preterm infants (14). The present study clearly shows that the contact of an acid solution at pH 2 with the laryngeal mucosa (surrogate for an acid gastro-laryngeal reflux) can trigger life-threatening reflexes in some non-sedated preterm lambs in the first week of age, which is clearly at variance with our previous observations in full-term lambs. In addition, the observation in preterm lambs of significant responses to saline, a stimulus similar to airway secretions (23) suggest that upper airway secretions / saliva can be responsible for LCR with significant cardiorespiratory responses in preterm newborn infants. Finally, we hypothesize that postnatal maturation of the LCR, as shown from D7 to D14 in preterm lambs, constitutes one of the mechanisms involved in the postnatal disappearance of apneas of prematurity when reaching a postconceptional age corresponding to full term gestation.

In conclusion, our results show that preterm birth favors the development of life-threatening LCR in lambs. Those results, together with the effect of caffeine treatment and LCR postnatal maturation, strongly suggest that LCR is involved in the apneic/bradycardic events observed in premature human infants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Christophe Grenier and Jean-Philippe Gagné, and the assistance of Marie-Pierre Garant for statistical analyses. BLES Inc, London, ON, graciously provided the surfactant. Marie St Hilaire is a scholar of the Canadian Institutes for Health Research. Jean-Paul Praud is a national scholar of the *Fonds de la recherche en santé du Québec*. The study was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (NRF 15558) and the Quebec Foundation for Research into Children's Diseases.

REFERENCES

1. **Bhatt-Mehta V, and Schumacher RE.** Treatment of apnea of prematurity. *Paediatr Drugs* 5: 195-210, 2003.
2. **Boggs DF, and Bartlett D Jr.** Chemical specificity of a laryngeal apneic reflex in puppies *J Appl Physiol* 53: 455-462, 1982.
3. **Davies AM, Koenig JS, and Thach BT.** Upper airway chemoreflex responses to saline and water in preterm infants. *J Appl Physiol* 64: 1412-1420, 1988.
4. **Downing SE, and Lee JC.** Laryngeal chemosensitivity; a possible mechanism for sudden infant death. *Pediatrics* 55: 640-649, 1975.
5. **Fortier PH, Reix P, Arsenault J, Dorion D, and Praud J-P.** Active upper airway closure during induced central apneas in lambs is complete at the laryngeal level only. *J Appl Physiol* 95: 97-103, 2003.
6. **Goding GS, Richardson MA, and Trachy RE.** Laryngeal chemoreflex: anatomic and physiologic study by use of the superior laryngeal nerve in the piglet. *Otolaryngol Head Neck Surg* 97: 28-38, 1987.
7. **Goto K, Mirmiran M, Adams MM, Longford RV, Baldwin RB, Boeddiker MA, and Ariagno RL.** More awakening and heart rate variability during supine sleep in preterm infants. *Pediatrics* 103: 603-609, 1999.

8. **Grogaard J, Lindstrom DP, Stahlman MT, Marchal F, and Sundell H.** The cardiovascular response to laryngeal water administration in young lambs. *J Dev Physiol* 4: 353-370, 1982.
9. **Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T, Walsh JH and Taylor IL.** Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr* 106: 467-471, 1985.
10. **Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, and Kahn A.** Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1298-1303, 2003.
11. **Kianicka I, Leroux JF, and Praud J-P.** Thyroarytenoid muscle activity during hypocapnic central apneas in awake nonsedated lambs. *J Appl Physiol* 76: 1262-1268, 1994.
12. **Lee JC, Stoll BJ, and Downing SE.** Properties of the laryngeal chemoreflex in neonatal piglets. *Am J Physiol* 2: R30-R36, 1977.
13. **Letourneau P, Dumont S, Kianicka I, Diaz V, Dorion D, Drolet R, and Praud J-P.** Radiotelemetry system for apnea study in lambs. *Respir Physiol* 116: 85-93, 1999.
14. **Lopez-Alonso M, Jose-Moya M, Antonio Cabo J, Ribas J, Del Carmen Macias M, Silny J, and Silfrim D.** Twenty-four hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 118: 299-307, 2006.

15. **Lucier GE, Storey AT, and Sessle BJ.** Effects of upper respiratory tract stimuli on neonatal respiration: reflex and single neuron analysis in the kitten. *Biol Neonate* 35: 82-89, 1979.
16. **Marchal F, Corke BC, and Sundell H.** Reflex apnea from laryngeal chemo-stimulation in the sleeping premature newborn lamb. *Pediatr Res* 16: 621-627, 1982.
17. **Martin RJ, Abu-Shaweesh JM, and Baird TM.** Apnoea of prematurity. *Paediatr Respir Rev* 5: S377-82, 2004.
18. **Martin RJ, and Abu-Shaweesh JM.** Control of breathing and neonatal apnea. *Biol Neonate* 87: 288-295, 2005.
19. **Menon AP, Schefft GL, and Thach BT.** Apnea associated regurgitation in infants. *J Pediatr* 106: 625-629, 1985.
20. **Page M, and Jeffery H.** The role of gastro-oesophageal reflux in the aetiology of SIDS. *Early Hum Dev* 59:127-149, 2000.
21. **Park HQ, Kim KM, Kim YH, Hong WP, Kim MS and Kim DY.** Age dependence of laryngeal chemoreflex in puppies. *Ann Otol Laryngol* 110: 956-963, 2001.
22. **Perkett EA, and Leroy Vaughan R.** Evidence for a laryngeal chemoreflex in some human preterm infants. *Acta Paediatr Scand* 71: 969-972, 1982.
23. **Pickens DL, Schefft G, and Thach BT.** Prolonged apnea associated with upper airway protective reflexes in apnea of prematurity. *Am Rev Respir Dis* 137: 113-118, 1988.

24. **Pickens DL, Schefft GL, and Thach BT.** Pharyngeal fluid clearance and aspiration preventive mechanisms in sleeping infants. *J Appl Physiol* 66: 1164-1171, 1989.
25. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Letourneau P, and Praud J-P.** Non-nutritive swallowing and respiratory coordination in full-term newborn lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 134: 209-218, 2003.
26. **Reix P, Arsenault J, Langlois C, Niyonsenga T, and Praud J-P.** Nonnutritive swallowing and respiration relationships in preterm lambs. *J Appl Physiol* 97, 1283-1290, 2004.
27. **Reix P, Dumont S, Duvareille C, Cyr J, Moreau-Bussiere F, Arsenault J, and Praud J-P.** Monitoring pulse oximetry via radiotelemetry in freely-moving lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 147: 65-72, 2005.
28. **Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, and Praud J-P.** Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1396-1404, 1999.
29. **St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, and Praud J-P.** Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in non-sedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* 98: 2197-2203, 2005.
30. **Storey AT, and Johnson P.** Laryngeal water initiating apnea in the lambs. *Exp Neurol* 47: 42-55, 1975.

31. **Thach BT.** Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111: 69S-77S, 2001.
32. **Thach BT.** The role of respiratory control disorders in SIDS. *Respir Physiol Neurobiol* 149: 343-353, 2005.
33. **Van Der Velde L, Curran AK, Filiano JJ, Darnall RA, Bartlett D Jr, and Leiter JC.** Prolongation of the laryngeal chemoreflex after inhibition of the rostral ventral medulla in piglets: a role in SIDS? *J Appl Physiol* 94: 1883-1895, 2003.
- Wetmore RF.** Effects of acid on the larynx of the maturing rabbit and their possible significance to the sudden infant death syndrome. *Laryngoscope* 103: 1242-1254, 1993.

Article 2

Marie St-Hilaire, Charles Duvareille, Olivier Avoine, Anne-Marie Carreau, Nathalie Samson, Philippe Micheau, Alexandre Doueik, Jean-Paul Praud. ***Effects of post-natal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs***. Soumis à J Appl Physiol.

Les reflux laryngo-pharyngés acides sont la remontée du contenu gastrique jusqu'au niveau du larynx. Très fréquents en période néonatale, ces reflux déclenchent, chez les nouveau-nés en santé, des mécanismes de protection (toux, déglutition et réaction d'éveil) afin d'éviter l'aspiration dans les voies aériennes inférieures. Malheureusement, chez certains nouveau-nés, des apnées-bradycardies réflexes sont parfois déclenchées par ces reflux et sont probablement impliqués dans des cas de mort subite du nourrisson. Certaines conditions, telles la prématurité et les infections respiratoires virales favorisent la survenue de ces apnées-bradycardies réflexes. Le but de ce projet est de tester l'hypothèse que l'exposition post-natale à la fumée secondaire a le même effet. Huit agneaux ont été exposés à la fumée secondaire (20 cig/jour) du 1^{er} au 16^{ème} jour de vie (J16) et comparés à 7 agneaux contrôles. Une instrumentation chirurgicale chronique a été effectuée à J14. À J15-J16, les chémoréflexes laryngés ont été induits par injection de 0.5 ml de sérum physiologique (contrôle négatif), d'eau distillée, HCl (pH 2) et de lait durant le sommeil calme et le sommeil agité. Les résultats démontrent qu'une exposition post-natale à la fumée secondaire engendre une inhibition cardiorespiratoire plus importante comparativement à un agneau non exposé. De plus, une

diminution des mécanismes de protection a été observée suite à une exposition à la fumée secondaire. L'exposition post-natale à la fumée secondaire modifie les chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né, suggérant ainsi que cette exposition est un facteur de risque pour le syndrome de mort subite du nourrisson.

**EFFECTS OF POSTNATAL SMOKE EXPOSURE ON LARYNGEAL
CHEMOREFLEXES IN NEWBORN LAMBS**

**Marie St Hilaire, Charles Duvareille, Olivier Avoine, Anne-Marie
Carreau, Nathalie Samson, Philippe Micheau, Alexandre Doueik,
Jean-Paul Praud**

From the Neonatal Respiratory Research Unit
Departments of Pediatrics and Physiology
Université de Sherbrooke

Running title: Laryngeal chemoreflexes and smoke exposure

ABSTRACT

Laryngeal chemoreflexes (LCR), which are elicited by the contact of liquids such as gastric refluxate with laryngeal mucosa, may trigger some cases of sudden infant death syndrome. Indeed, while LCR in mature mammals consist in lower airway protective responses, previous animal data have shown that LCR in immature newborns can include laryngospasm, apnea, bradycardia and desaturation. The present study was aimed at testing the hypothesis that postnatal exposure to cigarette smoke is responsible for enhancing cardiorespiratory inhibition observed with LCR. Eight lambs were exposed to cigarette smoke (20 cig/day) during 16 days and compared to seven control lambs. Urinary cotinine/creatinine ratio was measured at a level relevant to previously published levels in infants. On D15-D16, 0.5 ml of HCl (pH 2), milk, distilled water or saline was injected onto the larynx via a chronic supra-glottal catheter during sleep. Results showed that exposure to cigarette smoke significantly enhanced apneas and bradycardias during LCR while significantly decreasing swallowing and arousal. These results were observed independently of the state of alertness and of the experimental solution tested. In conclusion, 15 day-postnatal exposure to cigarette smoke increases cardiorespiratory inhibition and decreases lower airway protective mechanisms in non-sedated, full-term lambs.

KEYWORDS: Laryngeal chemoreflexes, cigarette smoke, lambs, sleep, sudden infant death syndrome

INTRODUCTION

In the mature organism, stimulation of the laryngeal mucosa receptor by liquids triggers highly protective reflexes, termed laryngeal chemoreflexes (LCR), which consist of coughing, arousal, and swallowing to prevent tracheal aspiration. In the newborn mammal however, LCR are quite different and are associated with vagal components such as laryngospasm, apnea, bradycardia and desaturation (48). The hypothesis that LCR can lead to apneas of prematurity, apparent life threatening events and sudden infant death syndrome stems from both daily clinical experience and experimental results (31, 37, 49). Personal results on LCR in full-term lambs during quiet sleep have shown that the LCR are consistently similar to the mature LCR reported in adult mammals and characterized by lower airway protective mechanisms with no significant apneas or bradycardias (42). These observations led us to hypothesize that the development of life-threatening cardio-respiratory events during LCR is linked to certain predisposing neonatal conditions, such as preterm birth (43).

Following worldwide “Back to sleep” campaigns, perinatal environmental tobacco smoke (ETS) exposure is now considered as the most important cause of SIDS, and especially due to ETS during pregnancy (1, 2, 3, 8, 21,

22, 34, 41). While SIDS has been reported to be increased 2 to 3 fold by postnatal ETS in some studies (4), partitioning the effects of post- from prenatal ETS is not straightforward in a clinical setting, most infants being exposed to both. Postnatal infusion of nicotine has previously been shown to significantly increase cardio-respiratory inhibition during LCR in newborn lambs, suggesting that postnatal exposure to cigarette smoke may predispose to SIDS via enhancement of LCR. However, the clinical relevance of the high dose of nicotine used was questioned (46). In addition, studies on nicotine alone are likely insufficient to unravel all of the potential effects of ETS, given that cigarette smoke in itself contains at least 4000 different chemical compounds. Hence, the present study was aimed at testing our hypothesis that postnatal ETS, at a nicotine level equivalent to that reported in human infants, enhances cardio-respiratory inhibition during LCR. We also aimed at assessing whether the state of alertness or type of solution used to trigger the LCR has an effect on the observed responses.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed in 15 lambs aged 15-16 days and weighing 3.1 (0.5) kg for the Control group and 3.6 (0.6) Kg for the Exposure group at time of experimentation. All lambs were born at term by spontaneous vaginal delivery and housed in our animal quarters (day light cycle 6:00-18:00) during the days of the experimentation. Lambs were bottle-fed *ad libitum* with ewe milk three times a day at 8 am, noon and 5 pm. The protocol of the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of our institution.

Secondary tobacco smoke exposure

Eight lambs were exposed to secondary tobacco smoke (smoke group; 20 cigarettes/day) during the first 16 days of life. The 8-hour daily exposure consisted in two periods of 4 hours separated by a 30 min pause at noon to bottle-feed the lamb and collect a urine sample for cotinine measurements using a urine bag (U-Bag 24-Hour for newborn Libertyville, IL, USA). Before and after exposure, the lamb was bottle-fed, its body temperature and weight measured and a blood sample was collected for arterial gas measurements. A cigarette-smoking machine was built in collaboration with the department of mechanical engineering of the Université de Sherbrooke. This custom-made equipment, which was fully

programmable *via* a user-friendly interface, smoked cigarettes automatically according to preset parameters, and produced a mixture of mainstream and sidestream smoke. The latter was vented into a 1.2 m x 1.2 m Plexiglas exposure chamber, where the non-restrained lambs stayed for the duration of the exposure. Preliminary experiments had shown that smoking 20 cigarettes / day induced levels of urinary cotinine at the upper limits of the range reported in infants exposed to cigarette smoke postnatally at home. Results obtained in the eight lambs exposed to secondary tobacco smoke were compared to a Control group (seven lambs), which were exposed to air in the same exposure chamber, for 8 hours daily and during 16 days.

Instrumentation of the lambs and recording equipment

Surgery was performed on the thirteenth day of smoke exposure (2-3 days before the first recording) under general anesthesia (2% isoflurane, 30% N₂O and 68% O₂). Atropine sulfate (0.1 mg/kg), ketamine (5 mg/kg) and ketoprofen (3 mg/kg) were injected intramuscularly prior to anesthesia, and 10 ml/kg lactate Ringer were infused intravenously throughout the surgical procedure. Antibiotics (2.5 ml/50 kg duplocilline and 5 mg/kg gentamicin) were also injected intramuscularly prior to anesthesia and once daily throughout the study. Bipolar, gold-plated stainless steel electrodes were inserted into the thyroarytenoid muscle (Ta; a glottal adductor) through the lateral aspect of the thyroid cartilage for recording Ta electrical activity (Ta

electromyogram; EMG). The electrode was then glued on the external surface of the thyroid cartilage. One bipolar electrode was usually placed in each Ta muscle to ensure that at least one Ta could be recorded in case of electrode damage. Two right-angled, platinum needle electrodes (E7-12, Grasse Instruments, Quincy, MA) were inserted into the parietal cortex directly through the skull, at the level of the lambda suture, 1 cm from the midline, for electroencephalogram (EEG) recording. A platinum needle electrode (E2-12, Grass Instruments) was also inserted under the scalp as a ground. For electrocardiogram (ECG) recordings, two additional needle electrodes (F-E2M, Grass Instruments) were inserted under the periosteum of the 5th rib, on both sides of the thorax, and directly glued on the rib. Leads from all electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back of the lambs. Correct positioning of the electrodes was systematically verified at autopsy. In addition, a supra-glottal catheter was inserted transcutaneously to allow injection of liquids onto the larynx. The catheter was adapted from an infusion catheter and positioned such that its tip was 5-7.5 mm above the anterior part of the glottis. A plastic tubing (internal diameter 1 mm) was subcutaneously tunneled in the neck of the lamb and connected to the external part of the catheter, which protruded 15-20 mm at the level of the anterosuperior aspect of the thyroid cartilage (15). Correct catheter positioning above the glottis was monitored throughout the insertion procedure by direct laryngoscopy and was

systematically confirmed during autopsy. Finally, an arterial catheter was inserted into the carotid artery for recording systemic arterial pressure.

Lamb instrumentation was completed immediately before recording in non-sedated lambs. Nasal airflow was recorded by use of the thermocouple wire (iron/constantan, type J; Omega Engineering, Stamford, CT) glued to the side of one nostril. Two platinum needle electrodes (E2-12, Grass Instruments) were placed subcutaneously into the outer upper region and the inner lower region of the right eye socket for electrooculogram (EOG) recording. Thoracic and abdominal elastic bands were placed for recording respiratory inductance plethysmography (Respirtrace, NIMS, Miami Beach, FL, USA) and to provide qualitative assessment of lung volume variations with respiration. A pulse oximeter sensor (Masimo Radical, Masimo®, Irvine, CA) was attached at the base of the tail for continuous monitoring of SpO₂ and pulse wave. Finally, the subcutaneous plastic tubing connected to the supraglottal catheter was attached to a custom-designed, radiotelemetry-driven injector, where the liquid to be injected was warmed and maintained at the lamb's body temperature. Leads from the EMG, EOG, EEG, and ECG electrodes and the nasal thermocouple were connected to a transmitter attached to the lamb's back immediately before the experiment. Raw EMG, EOG, EEG, and ECG signal, as well as nasal flow, were transmitted by a custom-made radiotelemetry equipment (32). The raw EMG signals were moving time averaged (100 ms). All

parameters were continuously recorded using an acquisition software (Acknowledge version 3.2, Biopac System, Santa Barbara, CA). Collected data were stored on compact disk for further analysis.

Design of the study

The study was designed to allow for simultaneous recording of Ta EMG, ECG, EEG, EOG, nasal flow, sum of thoracic and abdominal movements, and SpO₂, while triggering laryngeal chemoreflexes (LCR) by injection of liquids onto the larynx. Recordings were performed in non-sedated lambs on postnatal day 15 and 16 in the evening, following smoke exposure. The lambs were comfortably positioned on a mattress without contention. Baseline values of heart rate, respiratory rate, mean arterial pressure, SpO₂ and temperature were first logged. Each recording day consisted of a random sequence of 0.5 ml injections *via* the supra-glottal catheter of saline (0.9% NaCl, pH = 5.5, osmolarity = 326 mosM, [Cl⁻] = 181 mmol/l), distilled water (pH = 5.7), hydrochloric acid (HCl) diluted in saline (pH 2, osmolarity = 295 mosM, [Cl⁻] = 181 mmol/l), and ewe's milk [pH = 6,4 (SD 0,2), osmolarity = 336 (SD 92) mosM, [Cl⁻] = 38 (SD 11) mmol/l]. The number of solutions studied was limited by the necessity to repeat injections in two states of sleep and by the design of both our protocol (random sequence) and the telemetry injector, which cannot be loaded with two solutions at the same time. All solutions were injected once in both quiet sleep (QS) and active sleep (AS) (total of 8 injections per each

experimental day). In addition, the catheter was systematically flushed with 1 ml of saline between 2 injections of test solutions. Each animal was given at least 15 min of recovery time between two injections. Events such as agitation, cough, and arousal or full awakening were noted by an observer throughout the recording sessions.

Data analysis

The main objective of the study was to assess the effect of postnatal cigarette smoke exposure on LCR. In addition, we queried whether this effect was different in QS vs. AS, and from one experimental solution to another. Analysis of the LCR was performed as described previously (42). First, the cardiorespiratory responses to each laryngeal injection were assessed as follows. The percentage of decrease in heart rate (HR) [%dec HR = $(HR_{BL} - HR_{min}) * 100 / HR_{BL}$] was calculated, with HR_{BL} representing the baseline HR value averaged over 1 min before challenge, and HR_{min} representing the minimal HR value observed during the first min after the challenge. Moreover, any presence of bradycardia was noted, as defined by a %dec HR > 30%, as well as the number of bradycardias and total summed duration of bradycardias. The percentage of increase in mean arterial pressure (MAP) [%inc MAP = $(MAP_{max} - MAP_{BL}) * 100 / MAP_{BL}$] was calculated with MAP_{BL} representing the baseline MAP averaged 1 min before challenge, and MAP_{max} representing the maximal MAP value observed during the first min after challenge. The percentage of decrease

in respiratory rate (RR) [$\% \text{dec RR} = (\text{RR}_{\text{BL}} - \text{RR}_{\text{min}}) * 100 / \text{RR}_{\text{BL}}$] was also calculated, with RR_{BL} representing the baseline RR averaged 1 min before challenge, and RR_{min} representing the minimal RR value observed during the first min after challenge. The presence of apneas (defined as at least two missed breaths relative to baseline breathing) was assessed within 1 min after laryngeal stimulation. The number of apneas and the total summed duration of apneas were recorded. Moreover, the presence of any apneas longer than 5, 10, and 20 s was also noted. Respiratory LCR duration was measured as the time duration between the onset of the LCR and resumption of three consecutive breaths (50). Moreover, the percent of desaturation in the minute following laryngeal injection was noted, as defined by [$\% \text{decSpO}_2 = (\text{SpO}_{2\text{BL}} - \text{SpO}_{2\text{min}}) * 100 / \text{SpO}_{2\text{BL}}$], $\text{SpO}_{2\text{BL}}$ being SpO_2 averaged over 1 min before challenge. The time spent with SpO_2 below 90% and 85% was calculated, as well as the area under the same SpO_2 values. In addition to cardiorespiratory responses, the number of swallows (defined as a brisk, high-amplitude and short-duration Ta EMG) (36) occurring within the first minute after laryngeal stimulation was tallied. In addition, total summed duration of Ta EMG (total Ta EMG duration, indicating laryngeal closure) was calculated within 1 min after laryngeal stimulation for each stimulus. The presence of coughing was also noted (number of lambs which coughed/total number of lambs). Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define QS and AS from EEG, EOG and continuous visual observation (38). Cortical arousal

from QS was defined by the association of a change in EEG (decrease in amplitude + increase in frequency) for 3 s or more, with at least two of the following modifications: a 10% increase in HR, a change in RR or a body movement (24). Arousal from AS was recognized by direct observation of the lamb and disappearance of intense EOG activity. Full awakening was defined when the lamb was still awake after 1 min (18). Finally, the number of stimulations with arousal or full awakening was documented.

Urinary cotinine was measured using an Elisa immunoassay kit (Bio-Quant COTININE Direct Elisa San Diego USA). Collected samples (3 ml) were stored at - 20°C until analysis. Cotinine measurement was preferred to nicotine in this study because of its longer half-life (15-20 h vs. 30 min-2h respectively), its slow renal elimination and high urinary concentration (6- to 25-fold nicotine concentration). Creatinine was assayed in the Department of Biochemistry of the Université de Sherbrooke Hospital using their standard protocol. Cotinine / creatinine ratio was then calculated.

The larynx was immediately removed after euthanasia and placed in a formaldehyde solution (1/10). Specimens were cut and placed in a cassette for dehydration and fixation in paraffin. Paraffin blocks were cut using a microtome and slices were placed on a microscope slide for eosin-hematoxylin staining and subsequent observation. Laryngeal inflammation was assessed in 3 Control lambs and 4 Exposure lambs by a pathologist

expert in larynx pathology, using a previously described inflammation score (28). This score (15-point scoring system) is based on epithelial changes (intraepithelial inflammation, squamous metaplasia, epithelial attenuation, erosion, superficial ulcer, deep ulcer) and subepithelial changes (stromal inflammation, periglandular inflammation, granulation/fibrosis) observed following laryngeal injury.

Statistical analysis

Each stimulation was considered as an independent observation. A total of 95 stimulations for the Control group and 116 stimulations for the Exposure group were performed. Values were then expressed as means (\pm standard deviation, SD). For all variables, except for binary variables, the potential effect of exposure to smoke was assessed by the Student's t test or the Mann-Whitney U test, according to the presence or not of a normal distribution. In addition, the potential effect of solution or sleep state was assessed by one-way ANOVA or the Kruskal-Wallis test, according to the presence or not of a normal distribution. A post-hoc test was performed using the Bonferroni correction for multiple comparisons. For binary variables (cough, arousal and awakening), analyses were performed using the Chi-square test or the Fisher's exact test. Statistical analysis was carried out with the SPSS version 16.0 software. For all parameters, a $p < 0.05$ was considered as statistically significant, and a p value between 0.05 and 0.1 as indicative of a trend.

RESULTS

A total of 95 stimulations were performed in the Control group [QS: 14 saline, 14 distilled water, 13 HCl, 14 milk. AS: 12 saline, 10 distilled water, 9 HCl, 9 milk] and 116 stimulations in the Exposure group [QS: 16 saline, 16 distilled water, 16 HCl, 16 milk. AS: 12 saline, 11 distilled water, 15 HCl, 14 milk].

Passive smoking lamb model

All lambs tolerated the 16 day-exposure to cigarette smoke without any apparent problems. No differences in arterial blood gases were apparent between the Control and Exposure groups (results not shown). However, although not quantified, an increase in spontaneous activity was observed in lambs from the Exposure group, including head movements to verify surroundings and multiple jumps in the exposure chamber during long periods (20-30 min). Overall, mean weight increase was similar between both groups from the first post-natal day [Control group: 3.1 (0.5) Kg, Exposure group: 3.6 (0.6) Kg] to post-natal day 16 [Control group: 5.6 (1.7) Kg, Exposure group: 6.4 (1.4) Kg]. Baseline parameter values obtained in each group are detailed in Table 1. Values for baseline cardio-respiratory parameters (heart rate, respiratory rate and mean arterial pressure) in the Exposure group were significantly higher than in the Control group. However, while a statistically significant SpO_2 was observed in the Exposure group, the mean difference between groups (1%) was of no physiological significance. No differences in temperature were observed between the two groups. The cotinine/creatinine ratio was significantly higher in the Exposure group throughout the 16 days of exposure [1116

(832) ng/mg in the Exposure group vs. 15 (12) in Control group, $p < 0.0001$], as well as during the last two recording days [891(506) ng/mg vs. 11 (11) mg/mg, $p < 0.0001$].

Table 1
Baseline values for each group

	Control	Exposure
Heart rate (beats/min)	181 (23)	201 (30) ^a
Respiratory rate (breaths/min)	34 (11)	46 (12) ^a
Mean arterial pressure (mmHg)	79 (11)	88 (9) ^a
Temperature (°C)	39.9 (0.3)	39.7 (0.5)
Saturation (%)	99 (1.4)	98 (1.5) ^a

Values are expressed as means (Standard Deviation).
^a $p < 0.05$ vs. Control group

Effects of cigarette smoke exposure on laryngeal chemoreflexes

Results obtained during LCR are detailed in Table 2. Following two weeks of passive smoking, laryngeal stimulations (all solutions and both sleep states taken together) elicited significantly greater cardiorespiratory inhibition compared to the Control group. This inhibition included %decrease in heart rate, number of bradycardias, bradycardia duration, %decrease in respiratory rate, number of apneas, apnea duration and respiratory LCR duration. In addition, the % increase in mean arterial pressure ($p = 0.08$) tended to be lower in the Exposure group. No

differences were observed for SpO₂ variables ($p = 0.49$ to 0.93). Moreover, certain parameters measuring lower airway protective mechanisms were significantly decreased in the Exposure group, including the number of swallows and arousals. No differences were noted however for the number of coughs ($p = 0.27$), total duration of active glottal closure (measured by the thyroarytenoid muscle EMG, $p = 0.74$) and awakening ($p = 0.77$).

Detailed results on apnea duration show that apneas longer than 10 s were rare events in both the Exposure (3 apneas) and Control groups (2 apneas), with none above 20 s. However, apnea duration between 5 s and 9 s was more often observed in the Exposure group than in the Control group (48 vs. 21 apneas respectively). In addition, while bradycardia duration was statistically significantly longer in the Exposure group, all bradycardias (defined by % decrease in HR $> 30\%$) but one were shorter than 5 s. One severe event was observed in one lamb in the Exposure group following HCl injection in QS, with marked hypoventilation and a decrease in SpO₂ down to 76% (figure 1).

Table 2
Characteristics of laryngeal chemoreflexes following 16 day-exposure
to cigarette smoke

	Control	Exposure
%dec HR	21 (11)	28 (14) ^c
Nb. of bradycardias	0.2 (0.7)	0.5 (1) ^a
Bradycardia duration (s)	0.2 (0.7)	0.3 (0.7) ^a
%inc MAP	23 (16)	18(10)
%dec RR	51 (18)	67 (15) ^c
Nb. of apneas	1.1 (2.7)	2.2 (4.7) ^c
Apnea duration (s)	4.5 (8.3)	7.8 (8.5) ^c
Respiratory LCR duration (s)	13.2 (10)	14.8 (8.8) ^a
%dec saturation	3 (3)	3 (3)
Saturation; Area under 90%	0.04 (0.2)	0.06 (0.3)
Saturation; Area under 85%	0.01 (0.08)	0.02 (0.14)
Nb. of swallows	12 (10)	8 (7) ^a
Total Ta EMG duration (s)	2.2 (2.9)	2.5 (2.9)
Coughs (nb. of LCR with cough/total nb. of LCR)	14/94	11/116
Arousal (nb. of LCR with arousal/total nb. of LCR)	76/89	83/116 ^a
Awakening (nb. of LCR with awakening/total nb. of LCR)	48/89	55/116

Values are expressed as means (Standard Deviation). The results are means from all laryngeal stimulations (all solutions and all states of alertness) for each group. HR, heart rate; RR, respiratory rate; MAP, mean arterial pressure; %dec HR, RR or saturation, percentage decrease in HR, RR or O₂ saturation respectively; %inc MAP, percentage increase in MAP; LCR, laryngeal chemoreflexes; total Ta EMG, total duration of electrical activity of the thyroarytenoid muscle; nb, number. ^a p < 0.05 vs. Control. ^b p < 0.01 vs. Control. ^c p < 0.001 vs. Control

Effects of the type of solution on laryngeal chemoreflexes

The effects of type on solution are reported in table 3, with both sleep states taken together. ***In the Control group*** (table 3), injection of 0.5 ml of saline, water, HCl or milk onto the laryngeal mucosa elicited similar cardiorespiratory responses. However, the number of swallows triggered was greater after HCl comparatively to saline and water and greater after milk compared to saline. ***In the Exposure group***, desaturation magnitude was larger after HCl than water (4.2% vs. 1.7%), and respiratory LCR duration longer after HCl than with saline or milk. Swallowing was significantly more frequent with HCl than water and milk and more frequent with milk than saline. Arousal from QS or AS occurred more frequently after water (24 arousals/27 stimulations) than saline (15 arousals/28 stimulations). Finally, lambs were fully awakened more often after injection of water (17 awakenings/24 stimulations) and milk (19 awakenings/21 stimulations) than HCl (9 awakenings/23 stimulations).

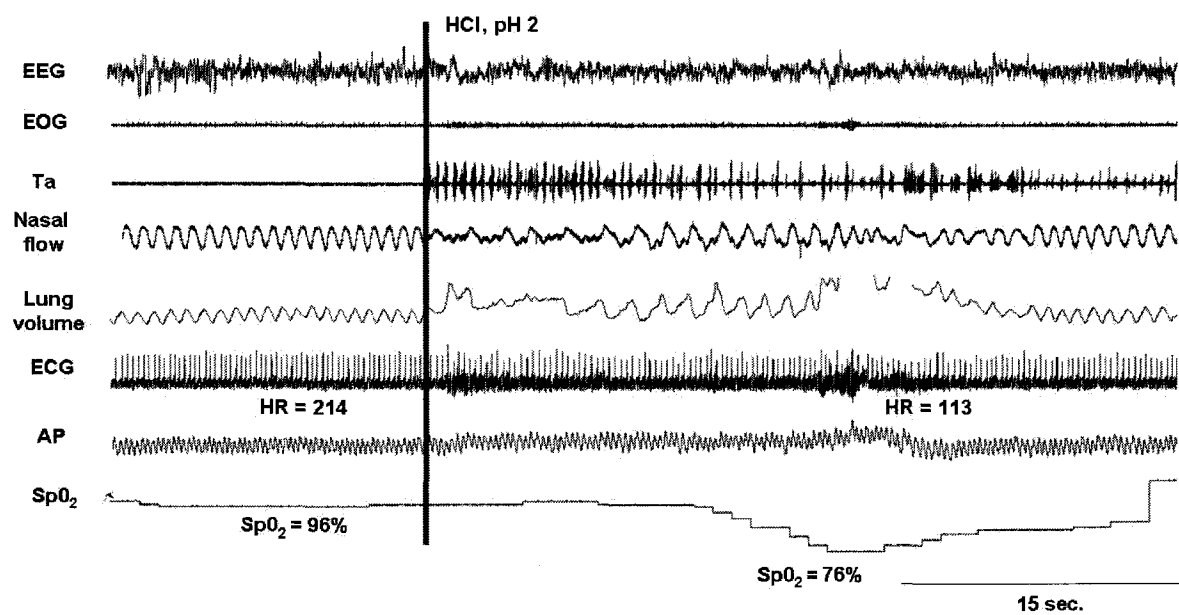
Exposure group compared to Control group. Regardless of the solution tested, triggered respiratory responses were more important in the Exposure group than in the Control group. These included the % decrease in respiratory rate, number of apneas and apnea duration (not shown in the table, saline $p = 0.02$; water $p = 0.01$; HCl $p = 0.02$; milk $p = 0.004$). In addition, water induced a significantly higher % decrease in heart rate, number of bradycardias and bradycardia duration (not

Table 3
Comparisons of laryngeal chemoreflexes elicited by saline, distilled water, hydrochloric acid and milk

		Saline	H ₂ O	HCl	Milk
%dec HR	Control	18 (9)	21(11)	22 (22)	23 (13)
	Exposure	33 (54)	30 (13) ^f	31 (28)	28 (13)
Nb. of bradycardias	Control	0.1 (0.6)	0.1 (0.3)	0.4 (0.4)	0.3 (0.9)
	Exposure	0.2 (0.5)	0.4 (0.6) ^e	0.9 (1)	0.3 (0.8)
%inc MAP	Control	15 (10)	18 (9)	29 (20)	25 (8)
	Exposure	16 (14)	18 (8)	19 (6)	25 (19)
%dec RR	Control	47 (18)	54 (14)	50 (11)	51 (19)
	Exposure	59 (19) ^a	71 (12) ^g	68 (10) ⁱ	69 (12) ^p
Nb. of apneas	Control	0.7 (2)	2 (5)	1 (7)	1 (1)
	Exposure	2 (5) ^a	4 (8) ^f	1 (5) ^j	2 (1) ^o
Respiratory LCR duration (s)	Control	10.4 (8)	12.4 (7)	16.3 (13)	13.2 (10)
	Exposure	12.1 (8)	15 (9)	19.5 (10) ^{c,q}	12.9 (6)
%dec saturation	Control	1.6 (1)	3.4 (4)	4.1 (2)	2.4 (2)
	Exposure	2.6 (3)	1.7 (1)	4.2 (2) ^h	2.9 (3)
Nb. of swallows	Control	6.1 (4)	12 (9)	19.1 (17) ^{b,e}	12 (7) ^a
	Exposure	4.4 (2)	5.7 (2)	14.7 (12) ^{i,q}	8.3 (4) ^d
Coughs (nb. of LCR with cough/total nb. of LCR)	Control	5/26	2/23	4/22	3/23
	Exposure	2/28	3/27	5/31	1/30
Arousal (nb. of LCR with arousal/total nb. of LCR)	Control	18/22	19/23	20/22	19/22
	Exposure	15/28	24/27 ^c	23/31	21/30
Awakening (nb. of LCR with awakening/total nb. of LCR)	Control	13/22	13/23	11/22	11/22
	Exposure	10/28	17/27 ^m	9/31	19/30 ⁿ

Values are expressed as means (SD). See table 2 for abbreviations. ^a p < 0.05 vs. saline in Control. ^b p < 0.001 vs. saline in Control. ^c p < 0.01 vs. saline in Exposure. ^d p < 0.001 vs. saline in Exposure. ^e p < 0.05 vs. H₂O in Control. ^f p < 0.01 vs. H₂O in Control. ^g p < 0.001 vs. H₂O in Control. ^h p < 0.01 vs. H₂O in Exposure. ⁱ p < 0.001 vs. H₂O in Exposure. ^j p < 0.05 vs. HCl in Control. ^k p < 0.01 vs. HCl in Control. ^l p < 0.001 vs. HCl in Control. ^m p < 0.05 vs. HCl in Exposure. ⁿ p < 0.001 vs. HCl in Exposure. ^o p < 0.01 vs. milk in Control. ^p p < 0.001 vs. milk in Control. ^q p < 0.05 vs. milk in Exposure.

Figure 1



Cardiorespiratory reflexes triggered in a lamb at post-natal day 15 after two weeks of exposure to cigarette smoke, following instillation of 0.5 ml hydrochloric acid onto laryngeal mucosa during quiet sleep. From top to bottom: EEG, electroencephalogram; EOG, electrooculogram; Ta, electrical activity of the thyroarytenoid muscle; Nasal Flow, nasal airflow; Lung volume, sum signal of the respiratory inductance plethysmograph, allowing qualitative measurement of respiration (inspiration upward); ECG, electrocardiogram; HR, heart rate (beats/min); AP, arterial pressure; SpO₂, oxygen hemoglobin saturation measured by pulse oximetry.

shown in the table, $p = 0.05$) in the Exposure group. No differences in % decrease in heart rate were observed for milk while responses tended to be more intense for saline and HCl ($p = 0.1$). Overall, the type of solution had no influence on differences observed in lower airway protective responses between the two groups.

Effects of the sleep state on laryngeal chemoreflex components

Table 4 depicts the effects of sleep states, all solutions taken together. *In the Control group*, while the cardiorespiratory responses appeared similar in both sleep states, depressed lower airway protective responses were observed in AS compared to QS. This included coughing, arousal, awakening and swallowing ($p = 0.1$, indicative of a tendency). *In the Exposure group*, some differences in cardiorespiratory responses were observed, including an increase in the number of apneas in AS and a heightened decrease in heart rate in QS, although no clear picture emerged. In addition, lower airway protective responses were identical in QS and AS.

Exposure group compared to Control group. Cardiorespiratory responses were greater in the Exposure group compared to Control group in both QS (%decrease in heart rate; %decrease in respiratory rate; number of apneas; %increase in mean arterial pressure) and AS

Table 4
Comparison of laryngeal chemoreflexes elicited in quiet sleep and active sleep

		Quiet sleep	Active Sleep
%dec HR	Control	22.5 (9)	20 (13)
	Exposure	29 (12) ^{b g}	27 (16) ^e
Nb. of bradycardias	Control	0.2 (0,5)	0.3 (0,7)
	Exposure	0.6 (1)	0.3 (0.8)
%inc MAP	Control	26.5 (17)	17 (12)
	Exposure	16.5 (10) ^a	19 (9)
%dec RR	Control	49 (19)	53 (17)
	Exposure	65.5 (16) ^c	69 (13) ^f
Nb. of apneas	Control	0.9 (1)	1.3 (4)
	Exposure	1.7 (4) ^b	2.9 (6) ^{d f}
Respiratory LCR duration (s)	Control	15 (12)	11 (6)
	Exposure	15.9 (10)	13.5 (7) ^e
%dec Desaturation	Control	3 (4)	2.5 (2)
	Exposure	3 (3)	2.5 (3)
Nb. of swallows	Control	13.5 (12)	9 (6)
	Exposure	9 (8) ^a	7.5 (5)
Coughs (nb. of LCR with cough/total nb. of LCR)	Control	12/55	2/41 ^a
	Exposure	8/64	3/50
Arousal (nb. of LCR with arousal/total nb. of LCR)	Control	47/51	28/37 ^a
	Exposure	49/64 ^a	34/52
Awakening (nb. of LCR with awakening/total nb. of LCR)	Control	35/47	13/28 ^b
	Exposure	33/49	22/34

Values are expressed as means (SD). See table 2 for abbreviations. ^a p < 0.05 vs. Control in quiet sleep. ^b p < 0.01 vs. Control in quiet sleep. ^c p < 0.001 vs. Control in quiet sleep. ^d p < 0.05 vs. Exposure in quiet sleep. ^e p < 0.05 vs. Control in active sleep. ^f p < 0.001 vs. Control in active sleep. ^g p < 0.05 vs. Exposure in active sleep.

(%decrease in heart rate; %decrease in respiratory rate; number of apneas; respiratory LCR duration). Swallowing and arousal were significantly decreased in the Exposure group in QS while no differences were observed in AS.

Effects of passive smoking on laryngeal mucosa

There was no observable effect of cigarette smoke exposure on laryngeal inflammation in the few lambs studied. Indeed, histological analysis showed the presence of a moderate inflammation in both the Control (score 9/15, n = 3 lambs) and Exposure (score 8/15, n = 4 lambs) groups.

DISCUSSION

The present study provides novel findings on laryngeal chemoreflexes triggered in non-sedated, full-term lambs following exposure to passive smoking in the early postnatal period. Overall, our findings reveal that laryngeal chemoreflexes after postnatal exposure to environmental tobacco smoke are characterized by enhanced cardiorespiratory inhibition and decreased lower airway protective reflexes. In addition, the absence of any significant laryngeal inflammation suggests that the effect is mainly at the level of the central nervous system.

Passive smoking lamb model

Most studies on the effect of ETS exposure have focused on nicotine alone, despite the fact that tobacco smoke contains at least 4000 different chemical compounds, many of which are known to be harmful to human health. We have recently built a new automatic smoking machine to study the effect of both mainstream and sidestream cigarette smoke (secondary smoke) (13). In the present study, we used our custom-built smoking machine to mimic postnatal parental smoking. Dosage of urinary cotinine ensured that the level of ETS exposure was relevant to previously published cotinine levels in infants (5, 6, 23, 27). The increase in baseline heart and respiratory rates following ETS is in agreement with previous results in both the human fetus and newborn (19). Absence of any increase in heart and respiratory rates following postnatal infusion of nicotine in newborn lambs (46) suggests that the effect on cardiorespiratory control may be shared with other constituents of cigarette smoke.

Effect of passive smoking on LCR

To our knowledge, despite its clinical importance, only one study has assessed the effect of ETS on LCR: passive smoking during gestation was shown to induce longer apneas during LCR in newborn rats only if combined with hyperthermia (51). Many methodological differences (prenatal exposure, sedation, injection of distilled water *via* tracheal catheter), in addition to species differences, can explain discrepant results with the present study. In keeping with our results however, the authors observed no life-threatening events, even when ETS was added to hyperthermia. The effect of nicotine alone on the cardiorespiratory components of the neonatal LCR has been addressed in three studies. In two studies conducted in sedated, newborn piglets, the effect of one injection of nicotine on LCR was inconsistent, either showing no effect (16) or an enhanced cardio-respiratory inhibition (17). In the third study in non-sedated, newborn lambs injected with IV nicotine during several days, an enhanced cardio-respiratory inhibition was reported during LCR in both room air and mild hypoxia (46). However, it was suggested that the high nicotine dose, which was more representative of that experienced by a light smoker than an infant exposed to passive smoking, was less clinically relevant with regards to post-natal infant exposure in the latter study.

Interestingly, aside from cardio-respiratory components, LCR in lambs elicit lower airway protective mechanisms, including swallowing and coughing. Our present observations that swallowing and coughing were prominent during LCR in Control lambs are in agreement with our previous results in healthy, full-term lambs (42). Conversely, swallowing was significantly blunted in Exposure lambs, a likely central effect, given the absence of

significant laryngeal inflammation. While active smoking has been previously shown to decrease reflexive pharyngeal swallowing (10, 11), this is the first observation of a decrease in swallowing induced by passive smoking. Decreased swallowing activity during LCR may lead to increased contact time between stimulating liquid and the laryngeal mucosa and, in turn, to enhanced LCR and deleterious cardio-respiratory events in the infant. Although we did not observe any differences in “coughing” in Exposure lambs, we must recognize that our study did not allow to fully assess coughing. Indeed, as we only counted the numbers of coughs and were not able to discriminate between “real” coughs and laryngeal expiratory reflexes (= brisk expiration not preceded by a deep inspiration), we cannot dismiss a decrease in cough efficiency. Quantification of coughing efficiency during LCR would be an interesting addition in future studies.

Our observation of decreased arousal during LCR following post-natal ETS may also be very relevant with regards to the increased in the occurrence of SIDS after ETS. Indeed, arousal plays a critical role in homeostasis, by increasing heart rate, blood pressure and respiratory rate, among others, (21) and arousal deficiency is likely present in a number of SIDS victims (26). Both maternal smoking and nicotine during pregnancy have been shown to affect arousal threshold (39), including after obstructive apnea, hypoxia and auditory stimuli (19). The present results represent the first account that post-natal passive smoking decreases arousal induced by laryngeal stimulation. Ability to arouse appears essential during some LCR, by relieving cough suppression (30, 45), promoting swallow reflexes (40) and cessation of apnea and bradycardia (47).

While the design of the present study does not allow us to comprehensively infer the mechanisms involved in the effects of post-natal ETS on LCR, the absence of significant laryngeal inflammation, which is in agreement with previous reports in adult smokers (12), does suggest that these effects are centrally mediated. Of note, brainstem nicotinic receptors are involved in the control of cardio-respiratory integration, arousal, REM sleep and somatic motor control (14, 25). In addition, exposure to nicotine increases GABA_a receptor density and increases GABA release, thus favoring breathing inhibition following LCR (33, 51). Aside from nicotine however, the potential role of the many constituents of cigarette smoke remains unknown.

Influence of various solutions or sleep states on laryngeal chemoreflexes

Conversely to previous results in healthy, full-term lambs aged 4-5 days, cardio-respiratory responses induced during LCR by water and HCl in 15 day-old Control lambs were identical to those observed after saline stimulation (42). This result is likely related to post-natal maturation of LCR, as previously reported (7). In agreement with our previous studies in 4-5 day-old full-term lambs and in preterm lambs (42, 43), the present results confirm that HCl triggers more swallowing activity than the other solutions in both Control and Exposure lambs. Results herein also show that ewe's milk can trigger cardio-respiratory events identical to other solutions, which is in agreement with previous reports in lambs, piglets and puppies (7, 9, 29, 22, 44) and provides clinical relevance with regards to LCR triggered during bottle-feeding or non-acid pharyngo-laryngeal reflux.

Overall, no distinctive pattern emerged with regard to a potential effect of one solution over the other on LCR in the Exposure vs. Control group. This lack of effect may however be related to the small number of lambs in each group. In this respect, the fact that the only severe desaturation event was observed in one lamb from the Exposure group is noteworthy.

Interestingly, AS was responsible for blunting lower protective mechanisms in the Control group. This effect was no longer observed in the Exposure group, which may be related to the blunting influence of post-natal ETS in itself. In addition, blunting of lower airway protective mechanisms in the Exposure group were present in QS, but not in AS. No systematic effects of the states of alertness on the differences on cardio-respiratory events in the Exposure vs. Control groups were observed, as previously reported in the preterm lamb (43).

Clinical implications

Clinical evidence strongly suggests that LCR can be triggered by numerous liquids, including upper airway secretions, milk bottle-feeding and both acidic and non-acidic laryngopharyngeal reflux (37). LCR are one of the mechanisms involved in apneas of prematurity, apparent life threatening events and probably some cases of the sudden infant death syndrome (26, 31, 37). Healthy, full-term lambs at birth already have mature-type LCR with efficient lower airway protective mechanisms and an absence of clinically significant apneas-bradycardias (42). Many conditions, such as hypoxia, anemia, hyperthermia, respiratory syncytial virus infection, and preterm birth (43, 48, 51) have been shown to enhance cardio-respiratory inhibition during LCR. The present findings show that

post-natal ETS, at a level consistent with clinical observations, can also contribute in altering LCR toward more cardio-respiratory inhibition and less airway protective mechanisms. However, our results suggest that, at least in lambs, post-natal ETS is most often insufficient in itself to trigger potentially dangerous reflexes. Nevertheless, it is important to emphasize that most infants exposed to passive smoking have additional risk factors, which are likely synergistic with LCR for explaining the failing chain of events ultimately leading to SIDS. These include preterm birth, pathological laryngo-pharyngeal reflux, prone position, respiratory viral infection and/or hyperthermia. Future studies will need to consider the effects of these multiple factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Jean-Philippe Gagné and Nathalie Samson, and Nathalie Carrier for statistics. The study was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Foundation of Stars (Quebec) allocated to J-P Praud. A-M Carreau was MD-MSc scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). Jean-Paul Praud is a member of the FRSQ-funded Clinical Research Center Étienne-Le Bel, Sherbrooke University Hospital.

REFERENCES

1. **Adgent MA.** Environmental tobacco smoke and sudden infant death syndrome: a review. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 77: 69-85, 2006.
2. **Alm B, Milerad J, Wennergren G, Skjaerven R, Oyen N, Norvenius G, Daltveit AK, Helweg-Larsen K, Markestad T, Irgens LM.** A case-control study of smoking and sudden infant death syndrome in the Scandinavian countries, 1992 to 1995. The Nordic Epidemiological SIDS Study. *Arch Dis Child* 78: 329-334, 1998.
3. **Alm B, Norvenius SG, Wennergren G, Skjaerven R, Oyen N, Milerad J, Wennborg M, Kjaerbeck J, Helweg-Larsen K, Irgens LM.** Nordic Epidemiological SIDS Study. Changes in the epidemiology of sudden infant death syndrome in Sweden 1973-1996. *Arch Dis Child* 84: 24-30, 2001.
4. **Anderson HR, Cook DG.** Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 52: 1003-1009, 1997.
5. **Anuntaseree W, Mo-Suwan L, Ovatlarnporn C, Tantana C, and Ma-a-Lee A.** Exposure to environmental tobacco smoke among infants in southern Thailand: a study of urinary cotinine. *Bull Environ Contam Toxicol* 80: 34-37, 2008.

6. **Blackburn CM, Bonas S, Spencer NJ, Coe CJ, Dolan A, Moy R.** Parental smoking and passive smoking in infants: fathers matter too. *Health Educ Res* 20: 185-194, 2005.
7. **Bogg DF, Bartlett JR.** Chemical specificity of a laryngeal apneic reflex in puppies. *J Appl Physiol* 53: 455-462, 1982.
8. **DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M.** Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 11: 1007-1015, 2004.
9. **Downing SE, Lee JC.** Laryngeal chemosensitivity: a possible mechanism for sudden infant death. *Pediatrics* 55: 640-649, 1975.
10. **Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z, Shaker R.** Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* 43: 537-541, 1998.
11. **Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z, Shaker R.** Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngoglottal closure reflex. *Gut* 51: 771-775, 2002.
12. **Duarte JL, Cardoso de Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, Francisco de Assis G.** Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. *Rev Bras Otorrinolaringol* 72: 210-216, 2006.
13. **Duvareille C, Beaudry B, St-Hilaire M, Boheimier M, Brunel C, Micheau P, Praud J-P.** Validation of a new automatic smoking

machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. *Lab Animals Submitted*.

14. **Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM.** Nicotine and brain development. *Birth Defects Res* 84: 30-44, 2008.
15. **Fortier PH, Reix P, Arsenault J, Dorion D, Praud J-P.** Active upper airway closure during induced central apneas in lambs is complete at the laryngeal level only. *J Appl Physiol* 95: 97-103, 2003.
16. **Froen FJ, Akre H, Stray-Pedersen B, Saugstad OD.** Adverse effects of nicotine and interleukin-1b on autoresuscitation after apnea in piglet: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 105: e52-e57, 2000.
17. **Froen JF, Akre H, Stray-Pedersen, Saugstad OD.** Prolonged apneas and hypoxia mediated by nicotine and endotoxin in piglets. *Biol Neonate* 81: 119-125, 2002.
18. **Goto K, Mirmiran M, Adams MM, Longford RV, Baldwin RB, Boeddiker MA, Ariagno RL.** More awakening and heart rate variability during supine sleep in preterm infants. *Pediatrics* 103: 603-609, 1999.
19. **Hafstrom O, Mileread J, Sandberg KL, Sundell HW.** Cardiorespiratory effects of nicotine exposure during development. *Respir Physiol Neurobiol* 149: 325-341, 2005.
20. **Harding R, Johnson P, McClelland ME.** Liquid-sensitive laryngeal receptors in the developing sheep, cat and monkey. *J Physiol* 277: 409-422, 1978.

21. **Horne RS, Franco P, Adamson TM, Groswasser J, Kahn A.** Influences of maternal cigarette smoking on infant arousability. *Early Hum Dev* 79: 49-58, 2004.
22. **Hunt CE, Hauck FR.** Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174: 1861-1869, 2006.
23. **Joseph DV, Jackson JA, Westaway J, Taub NA, Petersen SA, Wailoo MP.** Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch Dis Child* 92: F484-8, 2007.
24. **Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, Kahn A.** Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1298-1303, 2003.
25. **Kinney HC, O'Donnal TJ, Kriger P, White WS.** Early development changes in (3H) nicotine binding in human brainstem. *Neuroscience* 55: 1127-1130, 1993.
26. **Kinney HC, Thach BT.** The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361: 795-805, 2009.
27. **Kott KS, Salt BH, McDonald RJ, Jhawar S, Bric JM Joad JP.** Effect of secondhand cigarette smoke, RSV bronchiolitis and parental asthma on urinary cysteinyl LTE4. *Pediatr Pulmonol* 43: 8: 760-766, 2008.
28. **Koufman JA.** The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD); a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24hrs pH monitoring and an experimental investigation of

the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury.

Laryngoscope 101: 1-78, 1991.

29. **Lee JC, Stoll BJ, Downing SE.** Properties of the laryngeal chemoreflex in neonatal piglets. *Am J Physiol* 233: R30-36, 1977.

30. **Lee KK, Birring SS.** Cough and sleep. *Lung* 2009. Epub ahead of print.

31. **Leiter JC, Böhm I.** Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159:127-138, 2007.

32. **Letourneau P, Dumont S, Kianicka I, Diaz V, Dorion D, Drolet R, Praud J-P.** Radiotelemetry system for apnea study in lambs. *Respir Physiol* 116: 85-93, 1999.

33. **Luo Z, Costy-Bennett S, Fregosi RF.** Prenatal nicotine increases the strength of GABA receptor mediated inhibition of respiratory rhythm in neonates. *J Physiol* 561: 387-393, 2004.

34. **McDonnell M, Mehanni M, McGarvey C, Oregan M, Matthews TG.** Smoking: the major risk factor for SIDS in Irish infants. *Ir Med J* 95: 111-113, 2002.

35. **Moon RY, Horne RS, Hauck FR.** Sudden infant death syndrome. *Lancet* 4: 1578-1587, 2007.

36. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Letourneau P, Praud J-P.** Non-nutritive swallowing and respiratory coordination in full-term newborn lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 134: 209-218, 2003.

37. **Reix P, St-Hilaire M, Praud J-P.** Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr Pulmonol* 42: 674-682, 2007.
38. **Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud J-P.** Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1396-1404, 1999.
39. **Richardson HL, Walker AM, Horne RS.** Maternal smoking impairs arousal patterns in sleeping infants. *Sleep* 32: 515-521, 2009.
40. **Sato K, Nakashima T.** Sleep-related deglutition in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116: 747-753, 2007.
41. **Slotkin TA.** If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol Teratol* 30: 1-19, 2008.
42. **St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, Praud J-P.** Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in non-sedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* 98: 2197-2203, 2005.
43. **St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareilles C, Moreau-Bussiere F, Micheau P, Leblond J, Praud J-P.** Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102: 1429-1438, 2007.
44. **Storey AT, Johnson P.** Laryngeal water initiating apnea in the lambs. *Exp Neurol* 47: 42-55, 1975.

45. **Sullivan CE, Murphy E, Kozar LF, Phillipson EA.** Waking and ventilatory responses to laryngeal stimulation in sleeping dogs. *J Appl Physiol* 45: 682-689, 1978.
46. **Sundell HW, Karmo H, Milerad J.** Impaired cardiorespiratory recovery after laryngeal stimulation in nicotine-exposed young lambs. *Pediatr Res* 53: 104-112, 2003.
47. **Tirsoh E, Libon D, Bader D.** The effect of maternal smoking during pregnancy on sleep respiratory and arousal patterns in neonates. *J Perinatol* 16: 435-438, 1996.
48. **Thach BT.** Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111: 69S-77S, 2001.
49. **Thach BT.** Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl physiol* 104: 1828-1834, 2008.
50. **Van der velde L, Curran AK, Filiano JJ, Darnall RA, Bartlett D Jr, Leiter JC.** Prolongation of the laryngeal chemoreflex after inhibition of the rostral ventral medulla in piglets: a role in SIDS? *J Appl Physiol* 94: 1883-1895, 2003.
51. **Xia L, Crane-Godreau M, Leiter JC, Bartlett D.** Gestational cigarette smoke exposure and hyperthermic enhancement of laryngeal chemoreflex in rat pups. *Respir Physiol Neurobiol* 28: 161-166, 2009.

DISCUSSION

Depuis, les premières observations des CRL faites par Johnson au début des années 70, des avancées considérables ont été accomplies sur les CRL, mais, encore aujourd'hui, plusieurs inconnues et questions persistent. Mon projet de doctorat s'intègre parfaitement dans cette optique de pousser plus loin les connaissances actuelles sur les CRL, et plus particulièrement de comprendre l'influence que peut avoir certaines conditions néonatales fréquentes sur les CRL. Ces influences, soit une naissance prématurée ou une exposition à la fumée secondaire, peuvent modifier les réflexes cardiorespiratoires déclenchés suite à une stimulation laryngée. Les résultats obtenus suggèrent une implication des CRL dans des situations pouvant être, hélas, dramatiques chez les tous petits.

Les première et deuxième parties de la discussion porteront sur l'influence de la prématurité et d'une exposition à la fumée secondaire sur les CRL. Par la suite, certains éléments seront élaborés dans des sections spécifiques provenant autant de l'article 1 et de l'article 2, soit les stades de conscience, l'effet des différentes solutions et l'implication clinique de nos résultats. Finalement, les perspectives des CRL ouvriront la voie à de nombreux projets sur le sujet. À noter que certaines notions seront reprises de la discussion des 2 articles. De plus, certaines notions seront discutées en profondeur tandis que d'autres notions seront nouvelles.

Influence de la prématurité

L'article intitulé « *Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb* » apporte des résultats uniques sur la compréhension des CRL chez l'agneau prématuré. Cette étude montre qu'une stimulation laryngée chez l'agneau prématuré induit des événements cardiorespiratoires cliniquement significatifs qui, heureusement, disparaissent suite à une maturation post-natale de 2 semaines. Des données préliminaires indiquent également qu'un traitement avec un stimulant respiratoire, soit la caféine, induit une diminution des événements cardiorespiratoires observés.

1.1 Modèle d'agneau prématuré

Avoir un modèle d'agneau prématuré est loin d'être une chose facile et demande beaucoup d'investissement. Une gestation normale chez la brebis est de 147 jours, et volontairement, il a été choisi d'effectuer une césarienne à 132 jours de gestation. Il est difficile de savoir avec exactitude à quoi correspond cette gestation chez l'humain : s'agit-il plus d'un nouveau-né prématuré de 30 semaines ou de 36 semaines? Certains systèmes, par exemple le système locomoteur, sont beaucoup plus matures chez l'agneau prématuré comparativement aux nouveau-nés prématurés humains. Malgré ce fait, il reste évident que le système cardiorespiratoire demeure immature chez l'agneau prématuré à 132 jours

de gestation, résultat démontré par des instabilités respiratoires (RENOLLEAU *et al.*, 1999) et des anomalies du contrôle vagal de la respiration (ARSENAULT *et al.*, 2003) et des réponses cardio-respiratoires à l'hypoxie (PLADYS *et al.*, 2008). Par contre, les agneaux prématurés inclus dans l'étude des CRL étaient les agneaux les plus matures parmi toutes les naissances obtenues. En effet, l'immaturité était parfois à un point tel qu'un traitement médicamenteux et invasif (caféine, doxapram, ventilation assistée) s'avérait nécessaire, empêchant ces agneaux trop immatures de faire partie de l'étude. Un compromis devait être fait entre la survie et le niveau de prématurité. Malgré tout, des résultats intéressants ont pu être obtenus grâce à ce modèle unique qu'est l'agneau prématuré. L'agneau prématuré représente donc un modèle animal unique des apnées-bradycardies du prématuré et très pertinent aux études précliniques de cette pathologie.

1.2 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré

Une revue exhaustive de la littérature a permis de constater qu'une étude seulement a étudié les CRL dans un modèle animal prématuré (MARCHAL *et al.*, 1982). Cette étude, effectuée chez des agneaux prématurés entre 131 et 135 jours de gestation, a montré des résultats semblables à notre étude, soit des réponses cardio-respiratoires prolongées (apnées, bradycardies) suite à une stimulation laryngée avec de l'eau distillée (MARCHAL *et al.*, 1982). Les quelques études chez l'humain rapportent

des résultats similaires suite à une stimulation au niveau du pharynx chez les nouveau-nés prématurés (PERKETT et VAUGHAN, 1982; PICKENS *et al.*, 1988). Malgré la pertinence clinique évidente, aucune étude précédente n'avait utilisé une solution acide dans un modèle de prématuré. Notre étude chez le prématuré montre pourtant une tendance à engendrer des inhibitions cardio-respiratoires et des mécanismes de protection (toux, déglutition, réaction d'éveil) plus importants avec l'acide comparativement avec l'eau distillée, phénomène déjà observé dans une étude précédente chez l'agneau à terme (ST-HILAIRE *et al.*, 2005). La toux, les déglutitions et les réactions d'éveil sont des éléments essentiels nécessaires afin d'éviter l'aspiration pulmonaire. Chez l'agneau prématuré, la toux semble non efficace, car survenant à retardement et de faible amplitude. Il a déjà été décrit que chez le prématuré humain, la toux survient rarement et n'est pas une stratégie adéquate pour dégager le liquide du vestibule laryngé (DAVIES *et al.*, 1988; THACH, 2001; THACH, 2007). Des déglutitions répétées ont été observées chez l'agneau prématuré tel que rapporté chez le nouveau-né humain prématuré (DAVIES *et al.*, 1988; PICKENS *et al.*, 1989). Finalement, la réaction d'éveil chez l'agneau prématuré semble être moins souvent présente que chez l'agneau à terme (ST-HILAIRE *et al.*, 2005), phénomène pouvant engendrer des conséquences importantes. En effet, la réaction d'éveil est cruciale car elle favorise la toux, le réflexe de déglutition, et finalement est utile pour terminer les apnées et bradycardies

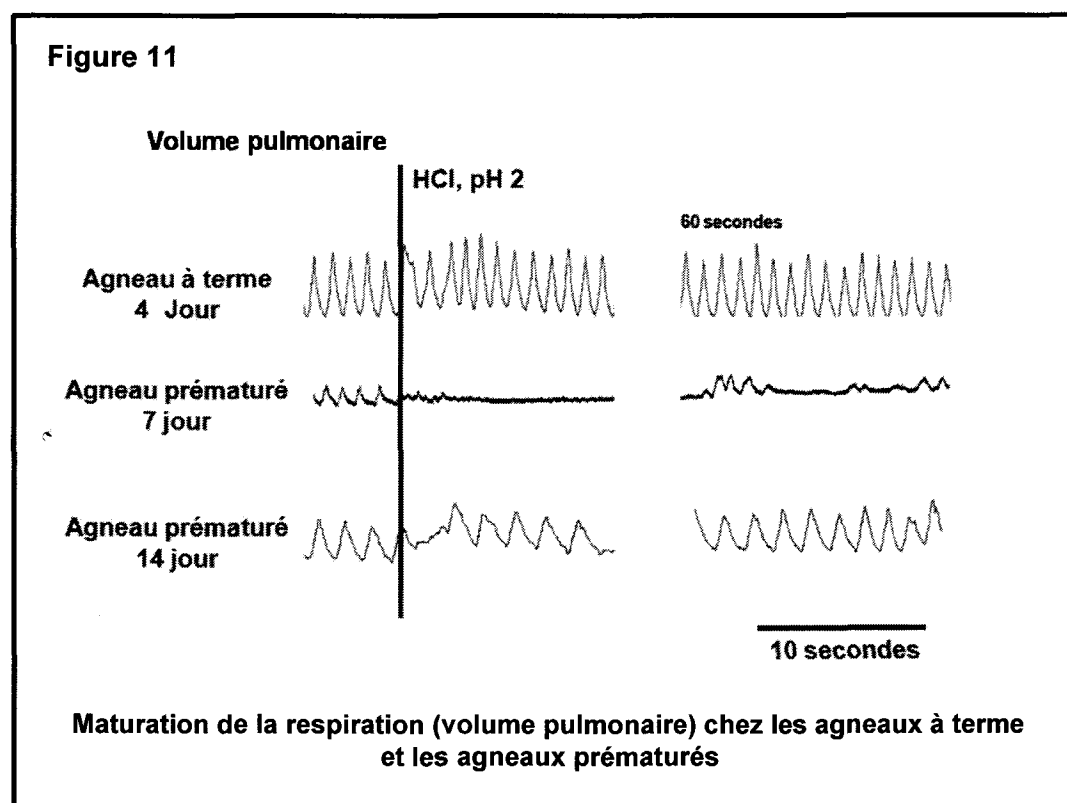
(SULLIVAN *et al.*, 1978; LEE et BIRRING, 2009; SATO et NAKASHIMA, 2007; TIROSH *et al.*, 1996).

L'immaturation centrale du contrôle respiratoire, une augmentation de la sensibilité des récepteurs laryngés et/ou l'aspiration sous-glottique avec stimulation des récepteurs trachéaux ont été impliqués pour expliquer les différences observées entre le nouveau-né prématuré et le nouveau-né à terme. Bien entendu, notre étude sur les agneaux prématurés n'a pas permis de connaître le mécanisme sous-jacent à l'exagération des réflexes laryngés. Par contre, il est connu que l'immaturation s'associe histologiquement à une diminution des connexions synaptiques, à une diminution de l'arborisation dendritique de même qu'à une myéline appauvrie dans plusieurs régions du cerveau dont le tronc cérébral, région des centres de contrôle de l'activité cardio-respiratoire, de la déglutition, de la toux et de la réaction d'éveil (ABU-SHAWEESH et MARTIN, 2008). Ainsi, ces changements histologiques peuvent expliquer, au moins en partie, les réponses exagérées obtenues chez les agneaux prématurés. D'autres hypothèses ont été émises afin d'expliquer les différences obtenues. Chez un nouveau-né, avant d'atteindre la muqueuse laryngée, un liquide pénètre une cavité située de chaque côté du larynx, nommée récessus piriforme. Deborah et al ont suggéré que chez les nouveau-nés prématurés, le récessus piriforme a une capacité moindre que chez les nouveau-nés à terme. Ce changement anatomique chez les prématurés

favorise le contact du liquide avec le larynx, déclenchant des réponses cardiorespiratoires plus importantes (PICKENS *et al.*, 1989).

1.3 Maturation post-natale des chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré

Selon nos résultats, les réflexes cardiorespiratoires potentiellement dangereux s'atténuent avec l'âge, laissant la place à des mécanismes de protection plus adaptés à la situation. Les réponses observées au 14^{ème} jour post-natal sont intermédiaires entre les agneaux prématurés au 7^{ème} jour post-natal et les agneaux à terme, voir figure 11 pour un exemple de la maturation respiratoire (ST-HILAIRE *et al.*, 2005).



Le plus marquant est qu'aucun évènement n'a mis en péril la vie de l'agneau au 14^{ème} jour. Les mécanismes de protection sont également plus présents : plus de toux, plus de réactions d'éveil. Comme l'immaturité centrale semble être la principale explication des résultats obtenus au 7^{ème} jour post-natal dans notre modèle d'agneau prématuré, il est logique de penser que des mécanismes centraux sont responsables de la maturation observée dans le cadre des CRL (THACH, 2007).

Influence d'une exposition à la fumée secondaire

L'article intitulé « *Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs* » apporte, lui aussi, des résultats uniques sur la compréhension des CRL en période néonatale. Une exposition post-natale de 2 semaines à la fumée secondaire induit une inhibition cardiorespiratoire plus importante comparativement aux agneaux non exposés, tout en diminuant les mécanismes de protection des VAI.

2.1 Modèle d'exposition à la fumée secondaire

Depuis que les effets néfastes de la cigarette sont connus, la nicotine a été la substance de choix pour l'étude d'une exposition à la fumée secondaire. Plusieurs considèrent la nicotine comme la substance psychoactive dans la cigarette (DWYER *et al.*, 2008). Par contre, avec ces 4000 composés chimiques, l'étude d'une exposition à la fumée secondaire est plus complexe que seulement la nicotine. Notre laboratoire, avec l'aide de la faculté de Génie de l'Université de Sherbrooke, a construit une machine capable de reproduire le plus fidèlement possible une exposition à la fumée secondaire. Le but est bien sûr d'imiter une exposition que pourrait subir un enfant à la maison. Pour répondre à cet objectif, la machine utilisée est munie d'un système capable de reproduire, de façon intermittente, autant le courant secondaire (fumée consommée dans un cendrier) que le courant tertiaire (fumée expirée par le fumeur) (DUVAREILLE *et al.*, soumis). De plus, le nombre de 20 cigarettes/jour

représente, selon le ratio cotinine/créatinine urinaire, une exposition similaire aux nourrissons ayant un ou 2 parents qui fument (ANUNTASEREE *et al.*, 2008; BLACKBURN *et al.*, 2005; JOSEPH *et al.*, 2007; KOTT *et al.*, 2008).

2.2 Effet de l'exposition post-natale à la fumée secondaire sur les chémoréflexes laryngés

Malgré la pertinence clinique évidente, aucune étude n'a étudié l'effet d'une exposition post-natale à la fumée secondaire sur les CRL. Par contre, comme la nicotine est pour plusieurs l'élément actif dans la fumée secondaire, trois études ont vérifié si une infusion post-natale de nicotine influençait les CRL. Par contre, les résultats de ces études sont contradictoires. L'équipe de Froen a ainsi démontré dans une étude, qu'une injection unique de nicotine entraîne une inhibition cardiorespiratoire plus importante comparativement aux contrôles (FROEN *et al.*, 2002) chez le cochonnet sous sédation. Tandis que dans une autre étude, la même équipe a aussi démontré qu'aucune différence n'a été observée avec une injection unique de nicotine. (FROEN *et al.*, 2000) dans le même modèle. Une autre équipe a également démontré des événements cardiorespiratoires plus importants chez des agneaux nouveau-nés ayant reçu des infusions quotidiennes de nicotine (SUNDELL *et al.*, 2003). Notre étude comble ainsi une place importante dans la littérature sur le sujet. L'utilisation de la fumée secondaire au lieu de la

nicotine, l'utilisation d'un modèle sans sédation/anesthésie, et l'analyse finement les CRL, rendent cette étude unique. Notre étude démontre que l'exposition à la fumée secondaire augmente l'inhibition cardiorespiratoire déclenchée suite à une stimulation laryngée, mais n'entraîne pas d'apnées-bradycardies potentiellement dangereuses, tel que démontré par l'absence de désaturation dans notre étude. La différence avec l'étude de Sundell, qui a retrouvé des apnées/bradycardies plus importantes, est probablement expliqué par les différences de méthodologie, dont une nicotémie se rapprochant plus d'un fumeur léger que d'une exposition à la fumée secondaire dans l'étude de Sundell. Plus récemment, une étude a regardé l'effet d'une exposition prénatale à la fumée de cigarette sur les apnées induites par de l'eau distillée chez le raton (XIA *et al.*, 2009). Comme l'exposition post-natale, l'exposition prénatale ne semble pas, dans cette étude, engendrer d'évènements cardiorespiratoires cliniquement significatifs plus importante comparativement aux contrôles (XIA *et al.*, 2009).

Il ne faut pas oublier que la présence d'un liquide, quel qu'il soit, sur la muqueuse laryngée induit des mécanismes de protection des VAS (THACH, 2008). Les déglutitions et la toux servent principalement à expulser le liquide étranger; l'absence de ces mécanismes de protection rend le nourrisson à risque d'aspiration (PICKENS *et al.*, 1989) et peut augmenter les évènements cardio-respiratoires en perpétuant le contact

entre le liquide et la muqueuse laryngée. Une étude antérieure montre que l'agneau né à terme possède des mécanismes de protection efficaces dès l'âge de 4 ou 5 jour permettant ainsi d'expulser le liquide du vestibule laryngé (ST-HILAIRE *et al.*, 2005). Ces mécanismes sont retrouvés chez l'agneau à 15 ou 16 jours postnatals. Cependant, une exposition post-natale à la fumée secondaire semble atténuer ces mécanismes de protection dont les déglutitions et les réactions d'éveil. Ces observations sont en accord avec les données obtenues dans certaines études antérieures. Ainsi, l'équipe de Dua a observé que les fumeurs actifs ont des seuils de déclenchement des déglutitions augmentés comparativement aux non-fumeurs (DUA *et al.*, 1998; DUA *et al.*, 2002). De plus, dans la quête d'un lien entre un défaut de la réaction d'éveil et le SMSN, de nombreuses études ont montré une diminution des réactions d'éveil lors d'une exposition prénatale à la fumée secondaire ou par la nicotine lors de nombreuses stimulations dont les apnées obstructives, l'hypoxie et des stimuli auditifs (revue dans HORNER *et al.*, 2004). Nos résultats permettent d'ajouter à la liste une diminution de la réaction d'éveil suite à une stimulation laryngée.

La toux ne semble pas être affectée par une exposition à la fumée secondaire dans notre modèle, contrairement à certaines études qui laissent supposer une diminution du seuil de déclenchement la toux chez les fumeurs (SITKAUSKIENE et DICPINIGAITIS, 2009). Jusqu'à

maintenant, les mécanismes de protection déclenchés suite à une stimulation laryngée incluaient la toux. La toux est généralement acceptée par plusieurs comme étant essentielle pour éviter l'aspiration. Par contre, certains croient que ce n'est pas la toux qui est mise à contribution pour éviter l'aspiration lors d'une stimulation laryngée. La toux comprend une profonde inspiration, suivie par une fermeture glottique puis une expiration très forte (MOINARD et MANIER, 2000). Le réflexe laryngé expiratoire décrit pour éviter l'aspiration est caractérisé plutôt par une phase expiratoire explosive sans inspiration préalable (LEE et BIRRING, 2009). Malgré la similitude entre les deux phénomènes, la toux et le réflexe laryngé expiratoire semblent être générés par des mécanismes neuronaux différents. Le sommeil n'aurait pas le même effet sur la toux que sur le réflexe expiratoire, le premier étant supprimé chez un sujet endormi tandis que le deuxième n'étant que peu ou pas modifié par le sommeil (LEE et BIRRING, 2009). Donc, il est possible qu'une exposition post-natale à la fumée secondaire diminue le seuil de la toux sans affecter le réflexe expiratoire. Notre étude, par sa méthodologie, ne peut malheureusement pas distinguer la toux du réflexe expiratoire.

Maintenant que nous avons montré qu'une exposition à la fumée secondaire modifie les réflexes déclenchés suite à une stimulation laryngée, il est intéressant de se questionner sur les mécanismes

physiopathologiques sous-jacents. Il peut s'agir de mécanismes locaux ou centraux.

Mécanismes locaux

Lorsque la fumée secondaire est inhalée, elle tapisse l'épithélium des VAS et des VAI. Par conséquent, il est logique de croire que cette fumée engendre des changements au niveau du larynx et/ou du pharynx. L'inflammation locale induite par l'inhalation de la fumée secondaire est la principale hypothèse de l'effet local de cette fumée. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il est connu que l'inflammation laryngée engendre des réponses cardiorespiratoires plus importantes suite à une stimulation laryngée. Ces résultats ont été observés chez les enfants infectés par le virus respiratoire syncytial (LINDGREN et GROGAARD, 1996) ou le *Bordetella pertussis* (THACH, 2007). Également, notre hypothèse est renforcée par le fait qu'il est connu que fumer induit un état inflammatoire local responsable de plusieurs maladies chroniques (BHALLA *et al.*, 2009) et semble être responsable de la modification des réflexes de la toux (SITKAUSKIEN et DICPINIGAITIS, 2009) et de la déglutition (DUA *et al.*, 1998; DUA *et al.*, 2002). Malgré toutes ces constatations, une exposition de 2 semaines à la fumée secondaire à raison de 20 cigarettes/jour n'engendre pas d'inflammation laryngée chez les agneaux dans notre étude et ne peut donc pas expliquer les résultats obtenus. Ces résultats sont congruents avec une étude de la littérature qui montre, elle aussi,

l'absence d'inflammation laryngée suite à une exposition à 10 cigarettes/jour chez le rat (DUARTE *et al.*, 2006).

Outre l'hypothèse d'inflammation laryngée, quelques autres études ont démontré que la fumée secondaire induit divers changements sur la muqueuse laryngée. Parmi ces changements, notons un effet sur les fibres C. Les fibres C sont des chémorécepteurs qui, lorsque stimulées, libèrent des médiateurs au niveau de la muqueuse laryngée telle la substance P et la neurokinine A, responsables d'un phénomène nommé inflammation neurogénique (TAI et BARANIUK, 2002; CANNING *et al.*, 2006). Ces médiateurs peuvent, à leur tour, stimuler d'autres récepteurs présents sur les fibres C et perpétuer ainsi, les réflexes déclenchés. Une exposition chronique à la fumée secondaire augmente l'inflammation neurogénique (BERGREN, 2001; TAI et BARANIUK, 2002; URREGO *et al.*, 2009), probablement par une augmentation de l'activité des fibres C (BERGREN, 2001). D'autres changements au niveau de l'épithélium ont été imputés à la nicotine. Une étude a démontré que la nicotine produit des radicaux libres et inhibe aussi le transport épithélial du sodium (ORLANDO *et al.*, 1986; WETSCHER *et al.*, 1995) au niveau de l'œsophage. À ce stade, nous ne pouvons savoir à quel point ces changements sont responsables de la modification des réflexes observés dans notre étude. D'autres études seront nécessaires pour découvrir l'effet local d'une exposition à la fumée en période postnatale immédiate.

Mécanismes centraux

Outre les mécanismes locaux, l'effet de la fumée secondaire peut s'expliquer par un effet central. Peu d'études ont regardé l'effet d'une exposition uniquement postnatale sur le cerveau humain, la majorité étudiant plutôt l'effet d'une exposition prénatale. Donc, il est difficile de savoir avec certitude l'effet d'une exposition post-natale seulement. Intéressant, chez le singe rhésus, une exposition post-natale dans les premiers mois de vie, a altérée le développement du cerveau d'une façon similaire qu'une exposition prénatale (SLOTKIN *et al.*, 2006). Cette observation est congruente avec les connaissances actuelles sur le développement sur le cerveau humain. Il est connu depuis longtemps que le développement du système nerveux central, dont les centres cardio-respiratoires, s'effectue autant dans l'environnement paisible du ventre de la mère que dans les premières semaines voire les mois suivant la naissance (CAROLL, 2003). Et un cerveau en développement est très vulnérable à de nombreux facteurs extérieurs (CARROLL, 2003; BAVIS et MITCHELL, 2008; DWYER *et al.*, 2009). Donc, pourquoi pas à une exposition post-natale à la fumée secondaire?

Plus concrètement, de nombreuses études ont démontré que la nicotine agit directement sur le cerveau via les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine présents au niveau du système nerveux central (CHANGEUX et TALY, 2008; DWYER *et al.*, 2008). De plus, il est

intéressant de noter que ces récepteurs nACh sont connus pour jouer un rôle fondamental dans le développement du cerveau, surtout dans la période où le cerveau est le plus vulnérable soit en période prénatale ou dans les premières semaines de vie (DWYER *et al.*, 2009). Bien entendu, selon la localisation des récepteurs, certaines régions du cerveau seront plus affectées par la nicotine que d'autres régions. Malheureusement, les récepteurs nicotiniques sont localisés en outre au niveau du tronc cérébral dans des régions impliquées dans le contrôle cardiorespiratoire, les réactions d'éveil, et le contrôle moteur somatique (KINNEY *et al.*, 1993; DWYER *et al.*, 2008). Quel est l'effet de la présence d'un agoniste extrinsèque de ces récepteurs sur le développement? De nombreuses études semblent montrer que la nicotine a un effet important sur plusieurs neurotransmetteurs excitateurs (acétylcholine, noradrénaline, dopamine, sérotonine) et inhibiteurs (glycine, GABA) *via* les récepteurs nACh. Ces neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs sont tous impliqués dans le contrôle cardio-respiratoire (CAMPOS *et al.*, 2009) et peuvent ainsi influencer les réponses déclenchées suite à une stimulation laryngée. Par exemple, il est connu qu'une exposition à la nicotine augmente les récepteurs GABAergiques et augmente la relâche du GABA inhibiteur, favorisant ainsi l'inhibition respiratoire observée lors d'un CRL (VAN DER *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2009). D'autres études ont montré qu'une exposition chronique à la fumée secondaire semble augmenter la libération de neuromodulateur (substance P) des fibres C

des VAI au niveau du noyau du faisceau solitaire, ce qui a probablement un impact sur les centres cardio-respiratoires (MUTOH *et al.*, 2000; BÖNHAM *et al.*, 2001). Aucune étude n'a montré le même phénomène pour les fibres C des VAS mais on peut imaginer que l'effet peut être similaire.

Mise à part la nicotine, certaines autres substances contenues dans la fumée secondaire peuvent être responsable de l'effet central de cette fumée. L'acide nitrique a un effet sur la neurogénèse (GIBBS, 2003) et certaines composantes de la fumée secondaire inhibent de façon irréversible une enzyme impliquée dans le métabolisme des catécholamines (monoamine oxydase) (FOWLER *et al.*, 2003). Finalement, l'exposition à la nicotine sur un cerveau en développement affecte la neurogénèse, la synaptogenèse, la migration et la différenciation des cellules neuronales (CAMPOS *et al.*, 2009), qui encore une fois peut influencer le contrôle respiratoire et par le fait même les CRL. Bref, la plasticité du cerveau est un phénomène complexe et de nombreux facteurs extérieurs peuvent probablement engendrer des conséquences dramatiques chez les nourrissons.

Stade de conscience

À la naissance, le sommeil est subdivisé en trois stades soit le sommeil calme (nREM), le sommeil agité (REM) et finalement le sommeil indéterminé (DAVIES *et al.*, 2004). Chaque période de sommeil est régie par des processus cérébraux bien distincts et des comportements physiologiques qui lui sont propres. Une seule étude à ma connaissance, a jusqu'à maintenant, regardé si les CRL étaient différents en sommeil calme ou en sommeil agité dans un modèle d'agneau prématuré (MARCHAL *et al.*, 1982). Cette étude est venue à la conclusion que des réponses similaires pouvaient être déclenchées entre les différents stades de sommeil. L'éveil, par contre, semble avoir des réponses moins importantes comparativement au sommeil calme et au sommeil agité en l'absence de réaction d'éveil. La présence de réaction d'éveil dans leur modèle induit des réponses similaires entre l'éveil et le sommeil. Malheureusement, nos études, qu'elles soient effectuées dans un modèle d'agneau prématuré ou d'agneau exposé à la fumée secondaire, ne permettent pas de tirer de conclusion claire sur ce sujet. Les périodes de sommeil agité sont très brèves chez l'agneau, et il arrive souvent que l'agneau ne fasse pas de sommeil agité, même après plusieurs heures d'expérimentation. Ainsi, moins d'expérience affecte la puissance des résultats rendant parfois difficile l'interprétation. D'autres expériences seront nécessaires pour vérifier l'effet des stades de conscience sur les CRL.

Salin vs Eau distillée vs Acide vs Lait
--

Dans le cadre de ces études sur les CRL, plusieurs solutions ont été utilisées, soit le salin, l'eau distillée, l'acide et dans la dernière étude, le lait. Le salin est considéré par plusieurs, dont notre équipe, comme une solution induisant peu de réponse cardiorespiratoire, et une injection de salin est traditionnellement utilisée pour inhiber les réponses déclenchées par l'eau distillée, le bicarbonate de sodium ou l'acide (GORGARRD *et al.*, 1982; LUCIER *et al.*, 1979; STOREY et JOHNSON, 1975; ST-HILAIRE *et al.*, 2005). Ainsi, le salin est surtout utilisé à titre de contrôle négatif. Contrairement au salin, l'eau distillée induit des réponses cardiorespiratoires marquées surtout chez les nouveau-nés (THACH, 2001; WETMORE, 1993). Par contre, chez l'agneau né à terme et âgé de 4 ou 5 jours, s'il est vrai que l'eau distillée provoque des CRL globalement plus marqués que le salin, ces CRC ne comprennent pas pour autant d'inhibition cardiorespiratoire marquée (ST-HILAIRE *et al.*, 2005). L'utilisation de l'eau est du point de vue clinique peu pertinente (sauf peut-être dans la situation d'une nébulisation à partir d'une tubulure utilisée pour ventilation nasale et dont les parois seraient recouvertes d'eau), mais elle continue d'être injectée dans nos études à titre de comparaison avec toutes les autres études effectuées sur les CRL. Elle constitue en quelque sorte un contrôle positif. Malgré la pertinence clinique évidente, soit celle d'un reflux laryngo-pharyngien acide (d'où l'utilisation d'un pH 2), très peu d'études ont utilisé des injections de solutions acides sur la muqueuse

laryngée. Les réponses cardiorespiratoires déclenchées suite à une solution acide ou d'eau distillée sont similaires, avec une tendance générale à engendrer des réflexes cardiorespiratoires plus importants avec l'acide que l'eau distillée. Par contre les mécanismes de protection des VAS sont prédominants avec les solutions d'acide (ST-HILAIRE *et al.*, 2005). Ceci est particulièrement évident avec les déglutitions, sans que l'on sache toutefois s'il s'agit de déglutitions efficaces. Parfois, il semble que la survenue des déglutitions à très haute fréquence lors des CRL est délétère chez nos agneaux, en étant responsable d'une hypoventilation marquée. Finalement, le lait n'a jamais été utilisé dans aucune autre des études de notre laboratoire. Le lait a une pertinence clinique importante, quand on pense à tous les nouveau-nés qui ont des apnées/bradycardies/désaturations pendant l'allaitement ou pendant le boire au biberon (GAUDA, 2003). Contrairement à notre étude, des apnées prolongées ont été observées dans des modèles de cochonnets et de chiots suite à une stimulation laryngée avec du lait (DOWNING et LEE, 1975; LEE *et al.*, 1977; BOGG et BARTLETT, 1982), mais l'utilisation d'un modèle sédationné ou anesthésié rend l'interprétation plus difficile. Une autre étude, a démontré chez le chiot âgé de deux semaines aucun effet d'une injection de lait sur la muqueuse laryngée. Dans notre modèle d'agneau âgé lui- aussi de deux semaines, le lait induit des réponses cardiorespiratoires similaires aux autres solutions (eau distillée, HCl). On pourrait ainsi facilement émettre l'hypothèse qu'une stimulation laryngée

avec le lait dans un modèle de prématuré provoquent des événements significatifs.

Dans notre modèle de prématuré et d'exposition à la fumée secondaire, la différence entre les solutions suit le même patron que chez les agneaux à terme âgés de 4 ou 5 jours. Autrement dit, les réponses cardiorespiratoires sont plus ou moins identiques entre l'acide chlorhydrique et l'eau distillée, mais l'acide induit des mécanismes de protection des VAI plus importants. Le salin, par contre, induit des réponses généralement moins marquées que l'eau distillée et l'acide dans notre modèle d'agneau prématuré, mais induit les mêmes réponses que les autres solutions chez les agneaux nés à terme et âgés de 15 ou 16 jours. Ce phénomène illustre bien la maturation postnatale déjà décrite des CRL (BOGGS et BARTLETT, 1982).

Une des choses à retenir est que les solutions acides induisent des mécanismes de protection des VAI plus importants que les autres solutions. L'acide et l'eau distillée, une fois présente sur la muqueuse laryngée, stimule probablement des récepteurs différents. Les protons stimulent au moins deux types de récepteurs soit les canaux sensibles au pH (ASIC, « acid sensing ion channels ») et les récepteurs ionotropiques des vanilloïdes (VR1 « vanilloid receptor »). Ces deux types de récepteurs sont retrouvés sur ce que l'on appelle les fibres sensibles à la

capsaïcine (fibre C et fibre Adelta) (REECH et KRESS, 2001; JULIUS et BASBAUM, 2001; MAMET et VOILEY, 2002), fibres fonctionnelles et retrouvées en grande quantité en période néonatale (REIX *et al.*, 2007). Ces fibres, impliquées dans la perception de la douleur, sont sensibles à de nombreuses solutions acides et insensibles à d'autres telle que l'eau distillée (FORSBERG *et al.*, 1988; MUTOH *et al.*, 2000; ROULIER *et al.*, 2003). A l'inverse, l'eau distillée stimule ce que l'on appelle des récepteurs à l'eau. Deux types de récepteurs à l'eau existent; un type de courte latence qui est stimulé par une faible concentration en ion chlorure (récepteur à adaptation rapide) tandis que l'autre, de longue latence, répond plutôt à l'hypoosmolarité (récepteur à adaptation lente) (ANDERSON *et al.*, 1990). La faible concentration en ion chlorure est un élément important des réponses déclenchées suite à une stimulation laryngée (BOGGS et BARTLETT, 1982). Le lait, avec une concentration en ion chlore de 38 mmol/L stimule probablement ces récepteurs à l'eau, à adaptation rapide. Comme l'acide stimule des récepteurs à la douleur, il est par conséquent logique de penser que les mécanismes de protection sont prédominants comparativement à une stimulation non douloureuse, comme l'eau distillée ou le lait.

Implications cliniques

Les conséquences des CRL sont connues depuis longtemps des néonatalogistes et des pédiatres. Les recherches effectuées dans notre laboratoire tentent justement d'expliquer dans quelles circonstances les CRL peuvent entraîner ces pathologies retrouvées en période néonatale. Par contre, comme dans tout projet, avant d'extrapoler les résultats de la recherche à la clinique, il faut savoir que certaines limites existent. Nos projets tentent de reproduire le plus fidèlement possible une situation où un liquide (les sécrétions des VAS, le lait ou un reflux acide laryngo-pharyngé) atteint le vestibule laryngé. La méthode choisie est celle d'injecter nos solutions via le cathéter supra-glottique, mais en réalité le liquide atteint la région laryngée soit de façon rétrograde ou soit *via* la région buccale. Il faut savoir que les mécanismes de protection déclenchés au niveau du larynx sont la dernière étape avant l'aspiration. La vie étant bien faite, plusieurs mécanismes autant anatomiques que physiologiques sont mis en place afin d'éviter qu'un liquide pénètre la région laryngée. Parmi les mécanismes anatomiques notons: le sphincter inférieur de l'œsophage, le péristaltisme de l'œsophage responsable de la clairance de l'acide, le sphincter supérieur de l'œsophage, et finalement la muqueuse du pharynx et du larynx (LIPAN *et al.*, 2006). Si ces mécanismes ne fonctionnent pas comme il devrait, le liquide atteint le pharynx d'où des déglutitions sont déclenchées pour permettre au liquide de retourner vers l'estomac (SHAKER et HOGAN, 2003). À peu près les mêmes principes

s'appliquent lors de la prise du biberon d'un nourrisson, les mécanismes de la déglutition et de la coordination respiration-déglutition dirigent le liquide dans le tractus digestif plutôt que vers le vestibule laryngé. Malgré la diversité de ces mécanismes physiologiques et anatomiques, il arrive qu'ils soient inefficaces, surtout en période néonatale du fait de leur immaturité, et que le liquide parvienne jusqu'à la muqueuse laryngée.

5.1 Influence de la prématurité

Situation fréquente en période néonatale, les apnées du prématuré seraient pour certains secondaires à un reflux laryngo-pharyngé dans 70% des cas (THACH, 2008), ce qui pourrait avoir des conséquences neuro-développementales importantes (ABU-SHAWEESH et MARTIN, 2008). Le lien entre apnée/bradycardie du nouveau-né et reflux est loin d'être un sujet simple à aborder; les uns y croient, les autres non. Si le premier article de cette thèse n'avait pas pour but de régler la controverse, il montre par contre de façon très claire, qu'un liquide appliqué sur la muqueuse laryngée, dont une solution acide, entraîne des événements cardiorespiratoires importants, qui peuvent dans certains cas mettre la vie de l'agneau nouveau-né prématuré en péril. La disparition de ces événements cardiorespiratoires sévères après une maturation de deux semaines est intéressante car elle reflète ce qui est vu en pratique clinique, les apnées du prématuré étant souvent résolues lorsque le nouveau-né atteint l'âge de 36 à 40 semaines d'âge post-conceptionnel.

L'hypoxémie résultant des apnées du prématuré peut entraîner des comorbidités importantes; hypoperfusion cérébrale, hypoxie-ischémie du cerveau, ... (STOKOWSKI, 2005). Ainsi, même si l'utilisation de médicament anti-reflux fait encore l'objet de discussion (FINER *et al.*, 2006), un traitement anti-reflux (position de l'enfant, épaissement du lait, domperidone, cisapride, antagoniste des récepteurs histaminiques H₂, inhibiteurs de la pompe à proton) adéquat peut diminuer l'incidence des reflux et empêcher le liquide gastrique d'atteindre la muqueuse laryngée (BIRCH et NEWELL, 2009). De plus, nos données préliminaires suggèrent fortement qu'un traitement avec la caféine diminue les apnées-bradycardies sévères, ce qui pose la question suivante. Les stimulants respiratoires sont utilisés en clinique pour traiter les apnées du prématuré d'origine centrale, mais est ce qu'un traitement avec la caféine pourrait être instauré même si les apnées sont secondaires à des CRL?

5.2 Influence d'une exposition à la fumée secondaire

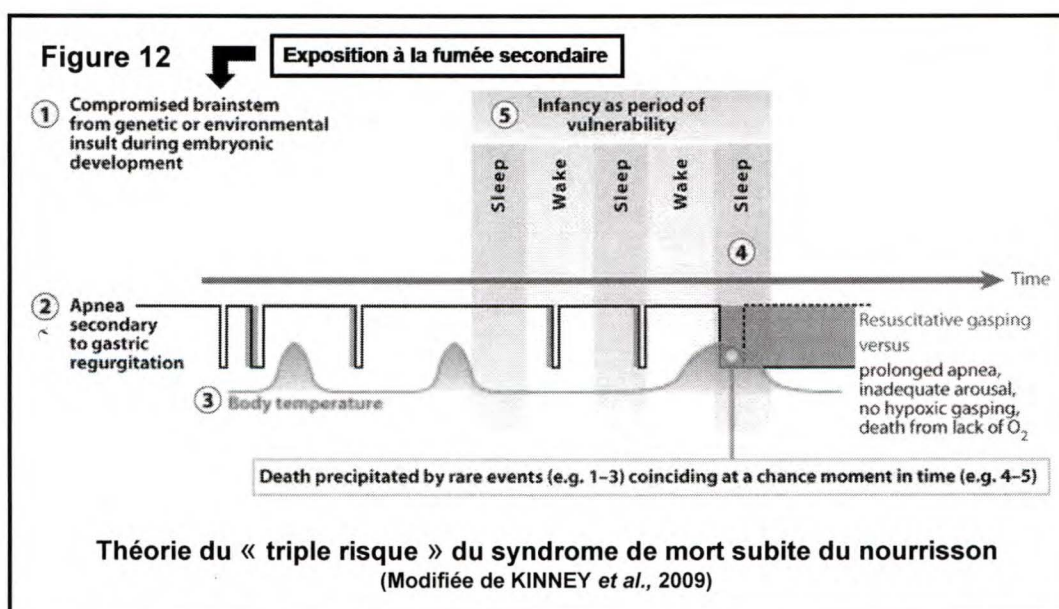
Problème de santé publique, l'exposition à la fumée secondaire est maintenant considéré comme le principal facteur de risque du SMSN. Malgré les nombreuses campagnes de publicité citant les effets néfastes de la cigarette, 15 à 37% des femmes enceintes fument durant leur grossesse et on estime que 38% des enfants entre 2 mois et 5 ans sont exposés d'une façon ou d'une autre à la fumée secondaire (HOLFHUIS *et*

al., 2003). Généralement, les gens associent la fumée secondaire à la nicotine. Cependant, la fumée secondaire contient plus de 4000 composés chimiques dont certains sont carcinogènes, mutagènes ou tératogènes (COLLIER et PRITSOS, 2003). Après la campagne « Dodo sur le dos » des années 1990, l'exposition de la fumée secondaire, qu'elle soit prénatale ou postnatale, est devenue le principal facteur de risque du SMSN, avec une augmentation de risque de 5 fois et de 2-3 fois respectivement (ANDERSEN et COOK, 1997; HAFSTROM *et al.*, 2005). Le SMSN est expliqué de nos jours, par la théorie du « triple risque ». Cette théorie élaborée en 1994 par l'équipe de Kinney stipule que trois éléments sont nécessaires pour le SMSN soit 1) un enfant vulnérable, 2) une période critique du développement et finalement, 3) un événement déclencheur. L'article « *Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs* » a justement tenté de combiner deux éléments de cette théorie du « triple risque ». En associant exposition à la fumée secondaire et CRL chez les agneaux à terme, nous avons constaté qu'effectivement l'exposition à la fumée modifie les réflexes déclenchés suite à une CRL. Mais, aucune stimulation n'a pu engendrer de près ou de loin à une réponse cardiorespiratoire potentiellement dangereuse. Cependant, en modifiant, par son action probablement centrale, le contrôle cardiorespiratoire, le nourrisson est plus à risque comparativement à un nourrisson de son âge sans exposition. Il est ainsi plus vulnérable, et l'exposition à la fumée de cigarette en période postnatale peut donc être

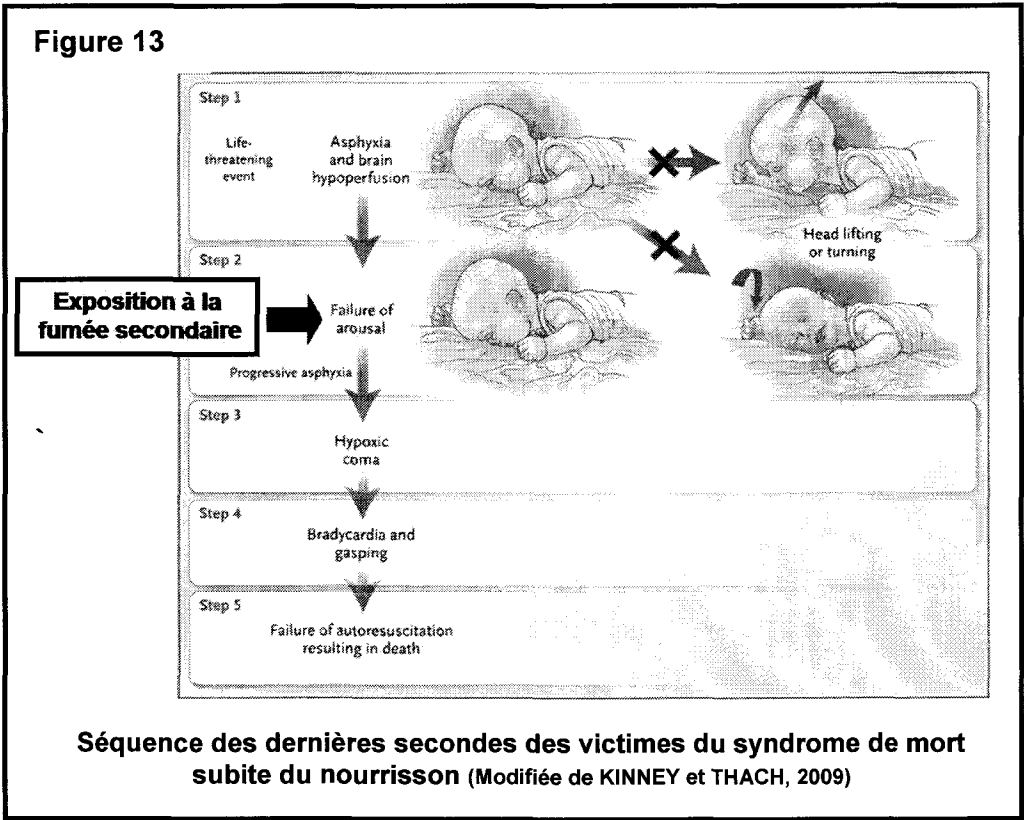
considérée comme un facteur de risque du SMSN. De plus en plus d'auteurs croient que l'interaction gène-environnement est primordiale. Les facteurs environnementaux (comme une exposition à la fumée secondaire) entraînent chez des nouveau-nés génétiquement prédisposés des réponses intrinsèques aberrantes (KINNEY et THACH, 2009b). Manquait-il ces prédispositions génétiques dans notre modèle d'agneau exposé à la fumée secondaire?

Les événements déclencheurs du SMSN sont multiples : position couchée sur le ventre, hyperthermie, infection des VAS, matelas mou, reflux laryngo-pharyngés, (HUNT et HAUCK, 2006; KINNEY *et al.*, 2009a; PAGE et JEFFERY, 2000). Expliquer la pathogénèse du SMSN est complexe et il faut probablement la coïncidence temporelle de plusieurs événements ou situations (qui pris individuellement n'engendre aucune réponse particulière) pour mettre en péril la vie du nourrisson. Les CRL seuls n'ont probablement aucun effet majeur mais peuvent probablement, lorsque combinés avec une infection des VAS, une laryngite ou la position couchée sur le ventre, entraîner des réponses cardiorespiratoires inhibitrices désastreuses. La figure 12 illustre très bien l'hypothèse que je préconise pour expliquer certains cas de SMSN. Tout d'abord, imaginons un nourrisson génétiquement prédisposé exposé à la fumée secondaire. L'interaction gène-environnement compromet les réponses normales du tronc cérébral (1). Ce nourrisson, qui ressemble à tous les nourrissons de

son âge, a un reflux laryngo-pharyngé. Normalement, des mécanismes de protection des VAI seraient déclenchés pour éviter l'aspiration mais, les réflexes normalement déclenchés sont modifiés laissant la place à des apnées-bradycardies (2). Ces apnées-bradycardies peuvent le plus souvent n'engendrer aucune conséquence dramatique. Par contre, un soir, comme tous les soirs, l'enfant est couché dans son lit. Mais ce soir-là, l'enfant est emmaillotté un peu trop (3). Le nourrisson, alors âgé entre 2 et 4 mois (5), s'endort (4) paisiblement. À un moment donné, suite à la survenue d'un reflux pharyngo-laryngé « banal », l'altération des systèmes de contrôle du tronc cérébral (fumée secondaire, hyperthermie) est responsable d'entraîner des réponses non adaptées à la situation. La mort survient par manque d'oxygène (KINNEY *et al.*, 2009a). Dans cette situation, l'hyperthermie a été un événement déclencheur choisi pour expliquer l'hypothèse, mais d'autres événements peuvent avoir les mêmes conséquences.



Revenons un peu plus en détails à la séquence d'événements survenant dans les quelques dizaines de secondes précédant un décès dans le syndrome de mort subite du nourrisson et comment une exposition à la fumée secondaire peut altérer les réponses normales. La figure 13, illustre très bien la situation. Dans toutes situations d'asphyxie, les réponses normales nécessitent des réactions d'éveil et des phénomènes d'auto-réanimation. La fumée secondaire peut modifier ces réponses, résultats démontrés dans notre étude par une diminution des réactions d'éveil induites par une stimulation laryngée. Une absence ou une diminution de la réaction d'éveil fait craindre le pire (figure 13) (KINNEY et THACH, 2009b).



Perspectives

La poursuite de la recherche sur les CRL en tant que modèle de réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs est nécessaire pour le traitement et la prévention de ces événements. En clinique, plusieurs traitements sont disponibles pour traiter les apnées du prématuré. Il serait intéressant de vérifier si les événements cardiorespiratoires déclenchés suite à une stimulation laryngée dans notre modèle d'agneau prématuré peuvent être prévenus par un traitement avec soit la caféine ou soit par la CPAP. L'utilisation de médicament anti-reflux serait également intéressant en tant que perspective de recherche. De nombreux projets peuvent être envisagés avec le modèle d'agneau exposé à la fumée. Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier l'effet d'une exposition prénatale sur les CRL. Ensuite, toujours dans notre modèle d'agneau exposé à la fumée secondaire, il serait pertinent cliniquement de combiner d'autres événements déclencheurs attribuables au SMSN avec les CRL (infection des VAS par le virus respiratoire syncytial, laryngite, ...). Finalement, l'étude effectuée dans le cadre de mes études graduées démontre un effet de la fumée secondaire. Vérifier quelles composantes de la fumée secondaire (ex : nicotine) est impliquée dans les résultats obtenus seraient un atout important dans la compréhension du lien entre CRL et fumée secondaire.

CONCLUSION

La protection des VAI est essentielle et surtout nécessaire à la vie! Dès les premiers instants de la vie, alors que le nouveau-né s'adapte à sa nouvelle vie extra-utérine, le larynx est là, exerçant son rôle. Peu importe ce qui peut arriver, de la salive, un reflux laryngo-pharyngé ou du lait, le larynx est prêt à réagir. Malheureusement, certaines conditions néonatales, telles la prématurité et l'exposition post-natale à la fumée secondaire, peuvent favoriser la survenue de réflexes potentiellement dangereux au détriment des mécanismes de protection efficace. Les réflexes inhibiteurs obtenus suite à une stimulation laryngée chez l'agneau prématuré sont probablement impliqués dans plusieurs cas d'apnées du prématuré, entraînant chez certains nouveau-nés des comorbidités importantes. Quant à l'exposition post-natale à la fumée secondaire, elle modifie les réponses cardiorespiratoires et les mécanismes de protection suite au contact entre un liquide et le larynx, faisant d'elle un facteur de risque important du SMSN. Des stratégies de prévention axées sur la réduction des naissances prématurées et sur la réduction du nombre de fumeur (femme enceinte et son entourage), pourrait permettre un développement mature des CRL chez les nouveau-nés. Toux, déglutition, réaction d'éveil, tout sera alors mis en œuvre pour éviter l'aspiration, comme il en est depuis quatre cents millions d'années, soit depuis l'apparition de ces fameux poissons pulmonés.

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup d'émotions, mais surtout avec une immense fierté qu'aujourd'hui, 12 mai 2010, je dépose cette thèse. Jour après jour, pendant les 7 dernières années, j'ai rêvé aux chémoréflexes laryngés. Que je sois dans la voiture, dans le métro, dans mon lit, et même en voyage, les chémoréflexes laryngés ont fait partis de ma vie quotidienne.

Les quatre dernières années, ont été des années où j'ai dû apprendre à jongler entre ma vie de chercheure et ma vie de clinicienne, entre ma vie sherbrookoise et ma vie montréalaise, entre ma vie professionnelle et ma vie personnelle! Si, aujourd'hui, j'ai réussi à accomplir cette thèse, c'est parce qu'à travers ma route, qui a été parfois cahoteuse, j'ai eu un support immense des gens qui m'entourent. Ces quelques lignes, qui vous sont dédiées, ne sont qu'une parcelle de toute la gratitude que j'approuve à votre égard.

L'alchimiste dit un jour au berger : « Et quand tu veux quelque chose, tout l'univers conspire à te permettre de réaliser ton désir ». Vous, qui êtes l'univers de ma vie, merci de m'avoir tracé la voie vers mes objectifs.

Au Dr. Jean-Paul Praud

Il y a 7 ans maintenant, je faisais mes premiers pas dans le domaine merveilleux qu'est la recherche. Durant toutes ces années, je n'ai jamais douté du soutien que tu avais à mon égard, ce qui m'a permis de passer à travers plusieurs épreuves au cours de ces années. Merci d'avoir tout simplement été là pour moi. Merci de m'avoir transmis la passion pour la recherche et de la médecine. Grâce à toi, je serai, j'espère, une clinicienne-chercheuse accomplie.

Aux étudiants de laboratoire, aux stagiaires, aux techniciennes, aux assistants de recherche

Je ne pourrai jamais oublier tout ce que vous avez fait pour moi! Un remerciement spécial à Charles, Nathalie et Jean-Philippe, qui sans eux, il aurait été difficile de poursuivre mon projet.

Au programme de Physiologie et à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

Merci d'avoir accepté la poursuivre de mes études graduées. Il n'était pas évident, il y a 4 ans, d'accepté d'avoir une étudiante active au doctorat tout en poursuivant des études de médecine, dans une autre ville. Merci de m'avoir fait confiance. Vos encouragements, m'ont apporté beaucoup.

A la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal

Plusieurs personnes de la Faculté de Médecine m'ont encouragé à poursuivre mes études graduées. Tout simplement merci!

À ma famille

Je ne pourrai jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Si aujourd'hui, j'ai réussi cet exploit d'avoir accompli des études dans deux programmes différents et dans deux villes différentes, c'est en grande partie, grâce à vous. Votre soutien, vos encouragements, votre patience, votre confiance en moi et surtout votre cœur immense, m'auront permis d'accomplir des grandes choses. Vous m'avez montré que quand on veut, on peut! Je vous adore!

À mes amis

Vos encouragements mais surtout votre écoute m'ont permis de traverser de grands obstacles. À mes amis sherbrookoïses qui m'encourageaient et me comprenaient dans mes études graduées et à mes amis montréalais qui eux, faisait la même chose mais dans mes études de médecine, merci! Je suis une personne privilégiée de vous connaître.

RÉFÉRENCES

Abu-Shaweesh JM, Martin RJ. Neonatal apnea: What's new? *Pediatric Pulmonology* 43: 937-944, 2008.

Anderson HR, Cook DG. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 52: 1003-1009, 1997.

Anderson JW, Sant'Ambrogio FB, Mathew OP, Sant'Ambrogio G. Water responsive laryngeal receptors in the dog are not specialized endings. *Respi Physiol* 79: 33-43, 1990.

Anuntaseree W, Mo-Suwan L, Ovatlarnporn C, Tantana C, Ma-a-Lee A. Exposure to environmental tobacco smoke among infants in southern Thailand: a study of urinary cotinine. *Bull Environ Contam Toxicol* 80: 34-37, 2008.

Arseneault J, Moreau-Bussière F, Reix P, Niyonsenga T, Praud J-P. *J Appl Physiol* 94: 1978-1986, 2003.

Bajanowski T, Vege A, Byard RW, Krous HF, Arnestad M, et al. Sudden infant death syndrome (SIDS) – Standardised investigations and classification; recommendations. *Forensic Science International* 165: 129-143, 2007.

Bancalari E. Apnea is not prolonged by acid gastroesophageal reflux in preterm infants. *Pediatrics* 116: 1217-1218, 2005.

Barrington KJ, Tan K, Rich W. Apnea at discharge and gastro-esophageal reflux in the preterm infant. *J Perinatology* 22: 8-11, 2002.

Bartlett D. Respiratory functions of the larynx. *Physiol reviews* 69: 33-57, 1989.

Bavis RW, Mitchell GS. Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *J Appl Physiol* 104: 1220-1229, 2008.

Bergren DR. Chronic tobacco smoke exposure increases airway sensitivity to capsaicin in awake guinea pigs. *J Appl Physiol* 90: 695-704, 2001.

Beuchée A, Nsegbe E, St-Hilaire M, Carrault G, Branger B, Pladys P, Praud J-P. Prolonged dynamic changes in autonomic heart rate modulation induced by acid laryngeal stimulation in non-sedated lambs. *Neonatology* 91: 83-91, 2007.

Bird JL, Newell SJ. Gastroesophageal reflux disease in preterm infants: current management and diagnostic dilemmas. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 94: F379-F383, 2009.

Bhalla DK, Hirata F, Rishi AK, Gairola CG. Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective. *J Toxicol Environ Health* 12: 45-64, 2009.

Blackburn CM, Bonas S, Spencer NJ, Coe CJ, Dolan A, Moy R. Parental smoking and passive smoking in infants: fathers matter too. *Health Educ Res* 20: 185-194, 2005.

Bland RD. Lung epithelial ion transport and fluid movement during the perinatal period. *Am J Physiol* 259: L30-37, 1990.

Bogg DF, Bartlett JR. Chemical specificity of a laryngeal apnea reflex in puppies. *J Appl Physiol* 53: 455-462, 1982.

Bonham AC, Chen LY, Mutoh T, Joad JP. Lung C fiber CNS reflex: role in the respiratory consequences of extended environmental tobacco smoke exposure in young guinea pig. *Environ Health Perspect* 109 suppl 4: 573-578, 2001.

Bradley RM. Sensory receptors of the larynx. *Am J Med* 108: 47S-50S, 2000.

Brooks JG. Apparent life threatening events and apnea of infancy. *Clin Perinatol* 4: 809-838, 1992.

Campos M, Bravo E, Eugenin J. Respiratory dysfunctions induced by prenatal nicotine exposure. *Clin Experim Pharmacol Physiol* 2009 Epub ahead of print.

Canning BJ, Mori N, Mazzone SB. Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. *Respir Physiol Neurobiol* 152: 223-242, 2006.

Carroll JL. Developmental plasticity in respiratory control. *J Appl Physiol* 94: 375-389, 2003.

Chan K, Kallama LK, Day L, Ogundipe A, Ross MG. Ovine fetal laryngeal chemoreflex thresholds and respiratory effects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 116: 91-96, 1997.

Changeux JP, Taly A. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol Med* 14: 93-102, 2008.

Collier AC, Pritsos CA. Environmental tobacco smoke in the workplace; an markers of exposure, polymorphic enzymes and implication for disease state. *Chemico-Biological Interaction* 146: 211-224, 2003.

Davies AM, Koenig JS, Thach BT. Upper airway chemoreflex responses to saline and water in preterm infants. *J Appl Physiol* 64: 1412-1420, 1988.

Davies KF, Parker P, Montgomery GL. Sleep in infant and young children: part one, normal sleep. *J Pediatric Health Care* 18: 65-71, 2004.

Downing SE, Lee JC. Laryngeal chemosensitivity: a possible mechanism for sudden infant death. *Pediatrics* 55: 640-649, 1975.

Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. Anatomie pour les étudiants. Edition Elsevier, Issy-les-Moulineaux cedex, France, 2006.

Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z, Shaker R. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* 43: 537-541, 1998.

Dua K, Bardan E, Ren J, Sui Z, Shaker R. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngoglottal closure reflex. *Gut* 51: 771-775, 2002.

Duarte JL, Cardoso de Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, Francisco de Assis G. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. *Rev Bras Otorrinolaringol* 72: 210-216, 2006.

Duvareille C, Beaudry B, St-Hilaire M, Boheimier M, Brunel C, Micheau P, Praud J-P. Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. Soumis.

Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res* 84: 30-44, 2008.

Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Therapeut* 122: 125-139, 2009.

Edner A, Wennborg M, Alm B, Lagercrantz H. Why do ALTE infants not die in SIDS? *Acta Paediatr* 96: 191-194, 2007.

Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathological findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonat* 65: 194-197, 1994.

Finer NN, Higgins R, Kattwinkel J, Martin RJ. Summary proceeding from the apnea of prematurity group. *Pediatrics* 117: S47-S51, 2006.

Forsberg K, Karlsson JA, Theodorsson E, Lundberg JM, Persson CG. Cough and bronchoconstriction mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Pulm Pharmacol* 1: 33-39, 1988.

Foucaud P, Vuillemin L, Vincelas C, Charara O, Nathanson S, Dommergues MA. Étiologies de malaises du nourrisson : interroger, examiner, où les explorations au service de la clinique. *Arch Pédiatrie* 11: 700-702, 2004.

Fowler JS, Logan J, Wang GJ, Volkow ND. Monoamine oxidase and cigarette smoking. *Neurotoxicology* 24: 75-82, 2003.

Fox AJ. Mechanisms and modulation of capsaicin activity on airway afferent nerves. *Pulm Pharmacol* 8: 207-215, 1995.

Froen FJ, Akre H, Stray-Pedersen B, Saugstad OD. Adverse effects of nicotine and interleukin-1b on autoresuscitation after apnea in piglet: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 105: e52-e57, 2000.

Froen JF, Akre H, Stray-Pedersen, Saugstad OD. Prolonged apneas and hypoxia mediated by nicotine and endotoxin in piglets. *Biol Neonate* 81: 119-125, 2002.

Gauda E. Upper airway muscle control during development: application to clinical disorders that occur in premature infants. In; Matew OP, editor. Respiratory control and disorders in the newborn. Lung biology in health and disease. Vol. 173; New york; Marcel Dekker, 2003.

Grogaard J, Lindstrom DP, Stahlman MT, Marchal F, Sundell H. The cardiovascular response to laryngeal water administration in young lambs. *J Dev Physiol* 4: 353-370, 1982.

Gibbs SM. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol* 27: 107-120, 2003.

Gilmartin GS, Thomas RJ. Mechanisms of arousal from sleep and their consequences. *Curr Opin Pulm Med* 10: 468-474, 2004.

Gouyon JB, Boggio V, Athias P, Moreau D, Pujol HP, Spinelli A. Frequency of gastroesophageal reflux in neonates as assessed by 24-h pH monitoring. *Helv Paediatr Acta* 41: 301-310, 1986.

Halstrom O, Milerad J, Sandberg KL, Sundell HW. Cardiorespiratory effects of nicotine exposure during development. *Respir Physiol Neurobiol* 149: 325-341, 2005.

Harding R, Johnson P, McClelland ME. Liquid-sensitive laryngeal receptors in the developing sheep, cat and monkey. *J Physiol* 277: 409-422, 1978.

Harned HS, Myracle J, Ferreiro J. Respiratory suppression and swallowing from introduction of fluids into the laryngeal region of the lamb. *Pediatric Res* 12:1003-1009, 1978.

Herbst JJ, Book LS, Bray PF. Gastroesophageal reflux in the near miss sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 92; 73-75, 1978.

Hofhuis W, De Jongste JC, Merkus PJFM. Advers Health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. *Arch Dis Child* 88: 1086-1090, 2003.

Horne RSC, Parslow PM, Harding R. Respiratory control and arousal in sleeping infants. *Pediatr Respir reviews* 5: 190-198, 2004.

Hunt CE. Gene-environment interactions: implications for sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* 90: 48-53, 2005.

Hunt CE, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174: 1861-1869, 2006.

Jeffery HE, Heacock HJ. Impact of sleep and movement on gastro-oesophageal reflux in healthy-newborn infants. *Arch Dis Child* 66: 1136-1139, 1991.

Johnson P, Salisbury DM, Storey AT. Apnea induced by stimulation of sensory receptors in the larynx. In: *Symposium on development of upper respiratory anatomy and function. Implications for sudden infant death syndrome*, edited by Bosma JF and Showacre J. Washington, DC: US Department of health, education and welfare: 160-185, 1975.

Joseph DV, Jackson JA, Westaway J, Taub NA, Petersen SA, Wailoo MP. Effect of parental smoking on cotinine levels in newborns. *Arch Dis Child* 92: F484-8, 2007.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852): 203-210, 2001.

Kazutoshi N, Yasuro A. Taste bud and nerve fibers in the rat larynx: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol* 67: 195-209, 2004.

Kinney HC. Abnormalities of the brainstem serotonergic system in the sudden infant death syndrome: a review. *Pediatric Develop Pathol* 8: 507-524, 2005.

Kinney HC, O'Donnal TJ, Kriger P, White WS. Early development changes in (3H) nicotine binding in human brainstem. *Neuroscience* 55: 1127-1130, 1993.

Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Ann Rev Pathol* 4: 517-550, 2009a.

Kinney HC, Thach BT. The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361: 795-805, 2009b.

Kliegman RM, Marcante KJ, Jenson HB, Behrman RE. Essential of pediatrics, Nelson. Edition Elsevier, Philadelphie, État-Unis, 2006.

Koizumi H. On sensory innervation of larynx in dog. *Tohoku J Exp Med* 58: 199-210, 1953.

Kott KS, Salt BH, McDonald RJ, Jhavar S, Bric JM, Joad JP. Effect of secondhand cigarette smoke, RSV bronchiolitis and parental asthma on urinary cysteinyl LTE4. *Pediatr Pulmonol* 43: 8: 760-766, 2008.

Kovar I, Selstam U, Catterton WZ, Stahlman MT, Sundell HW. Laryngeal chemoreflex in newborn lamb: respiratory and swallowing response to salts, acids, and sugars. *Pediatric Res* 13: 1144-1149, 1979.

Lanier B, Richardson MA, Cummings C. Effect of hypoxia on laryngeal reflex apnea-implication for sudden infant death. *Otolaryngol Head Neck Surg* 91: 597-604, 1983.

Lau C. Developpement de l'oralité chez le nouveau-né prématuré. *Arch Pédiatrie* 14: S35-S41, 2007.

Leape LL, Holder TM, Franklin JD, Amoury RA, Aashcraft KW. Respiratory arrest in infants secondary to gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 60: 924-928, 1977.

Lee KK, Birring SS. Cough and Sleep. *Lung*. 2009. Epub ahead of print.

Lee JC, Stoll BJ, Downing SE. Properties of the laryngeal chemoreflex in neonatal piglets. *Am J Physiol* 233: R30-36, 1977.

Leiter JC, Bohm I. Mechanism of pathogenesis in the sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 127-138, 2007.

Lindgren C, Groggaard J. Reflex apnoea response and inflammatory mediators in infants with respiratory tract infection. *Acta Paediatr* 85: 798-203, 1996.

Lindgren C, Jing L, Graham B et al., Respiratory syncytial virus infection reinforces reflex apnea in Young lambs. *Pediatr Res* 31: 381-385, 1992.

Lipan MJ, Reidenberg JS, Laitman JT. Anatomy of reflux: a growing health problem affecting structures of the head and neck. *Anatomical record* 289B: 261-270, 2006.

Loghmanee DA, Weese-Mayer DE. Sudden infant death syndrome; another year of new hope but no cure. *Curr Opin Pulm Med* 12: 497-504, 2007.

Lucier GE, Storey AT, Sessle BJ. Effects of upper respiratory tract stimuli on neonatal respiration: reflex and single neuron analyses in the kitten. *Biol Neonate* 35: 82-89, 1979.

Luo Z, Costy-Bennett S, Fregosi RF. Prenatal nicotine increases the strength of GABA receptor mediated inhibition of respiratory rhythm in neonates. *J Physiol* 561: 387-393, 2004.

Maggio AM, Schappi MG, Benkebil F, Posfaay-Barke KM, Belli DC. Increased incidence of apparently life threatening events due to supine position. *Paediatr Perinatol Epidemiol* 20: 491-496, 2006.

Mamet J, Voilley N. Les canaux sodiques activés par l'acidification extracellulaire et la douleur inflammatoire. *Medecine Sciences* 18: 889-895, 2002.

Marchal F, Corke BC, Sundell H. Reflex apnea from laryngeal chemostimulation in the sleeping premature newborn lamb. *Pediatr Res* 16: 621-627, 1982.

McGovern MC, Smith MB. Causes of apparent life threatening events in infants: a systematic review. *Arch Dis Child* 89: 1043-1048, 2004.

McKelvey GM, Post EJ, Wood AKW, Jeffery HE. Airway protection following simulated gastro-esophageal reflux in sedated and sleeping neonatal piglets during active sleep. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 533-539, 2001.

McNamara F, Wulbrand H, Thach BT. Characteristics of the infant arousal response. *J Appl Physiol* 85: 2314-2321, 1998.

Miller AJ, Dunmire CR. Characterization of the postnatal development of superior laryngeal nerve fibers in the postnatal kitten. *J Neurobiol* 7: 483-494, 1976.

Milner AD, Geenough A. The role of the upper airway in neonatal apnoea. *Semin Neonat* 9: 213-219, 2004.

Moinard J, Manier G. Physiologie de la toux. *Rev Mal Respir* 17: 23-28, 2000.

Molloy EJ, Di Fore JM, Martin RJ. Does gastro-esophageal reflux cause apnea in preterm infants? *Biol Neonate* 87: 254-261, 2005.

Moon RY, Fu LY. Sudden infant death syndrome. *Pediatr review* 28: 209-213, 2007.

Moon RY, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370: 1578-1587, 2007.

Mutoh T, Joad JP, Bonham AC. Chronic passive cigarette smoke exposure augments bronchopulmonary C inputs to nucleus tractus solitarii neurons and reflex output in young guinea-pigs. *J Physiol* 523: 223-233, 2000.

Mutoh T, Tsubone H, Nishimura R, Sasaki N. Effects of volatile anesthetics on vagal C-fiber activities and their reflexes in anesthetized dogs. *Respir Physiol* 112: 253-264, 1998.

Naida AM, Ghosh TK, Mathew OP. Airway protective reflexes elicited by laryngeal ammoniac: role of C-fiber afferents. *Respir Physiol* 103: 11-17, 1996.

Nezelof C. The pediatric pathology: a speciality with a future? *Arch Pediatr* 13: 1-3, 2006.

Opdal SH, Rognum TO. The sudden infant death syndrome gene; Does it exist? *Pediatrics* 114: e506-e512, 2004.

Orlando RC, Bryson JC, Powell DW. Effect of cigarette smoke on esophageal epithelium of the rabbit. *Gastroenterol* 91: 1536-1542, 1986.

Page M, Jeffery H. The role of gastro-oesophageal reflux in the aetiology of SIDS. *Early Hum Dev* 59: 127-149, 2000.

Park HQ, Kim KM, Kim YH, Kim MS, Kim DY. Age dependence of laryngeal chemoreflex in puppies. *Ann otol rhino laryngol* 110: 956-963, 2001.

Perkett EA, Vaughan L. Evidence for a laryngeal chemoreflex in some human preterm infants. *Acta Paediatr Scan* 71: 969-972, 1982.

Pickens DL, Schefft GL, Thach BT. Prolonged apnea associated with upper airway protective reflexes in apnea of prematurity. *Am Rev Respir Dis* 137: 113-118, 1988.

Pickens DL, Schefft GL, Thach BT. Pharyngeal fluid clearance and aspiration preventive mechanisms in sleeping infants. *J Appl Physiol* 66: 1164-1171, 1989.

Praud JP, Reix P. Upper airways and neonatal respiratory. *Respi Physiol Neurobiol* 149: 131-141, 2005.

Pladys P, Arsenault J, Reix P, Rouillard Lafond J, Moreau-Bussière F, Praud J-P. Influence of prematurity on postnatal maturation of heart rate and arterial pressure responses to hypoxia in lambs. *Neonatology* 93: 147-205, 2008.

Poets CF. Gastro-esophageal reflux; a critical review of its role in preterm infants. *Pediatrics* 113: e128-e132, 2004.

Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol* 1: 45-51, 2001.

Reix P, St-Hilaire M, Praud J-P. Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr Pulmonol* 42: 674-682, 2007.

Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud J-P, Gagné B. Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apnea in preterm lambs. *Am J Resp Crit Care Med* 159: 1396-1404, 1999.

Ross MG, Nijland MJ. Development of ingestive behaviour. *Am J Physiol* 274: R879-893, 1998.

Roulier S, Arsenault J, Reix P, Dorion D, Praud J-P. Effects of C fiber blockage on cardiorespiratory responses to laryngeal stimulation in conscious lambs. *Respi Physiol Neurobiol* 136: 13-23, 2003.

Roux E. Origine et évolution de l'appareil respiratoire aérien des vertébrés. *Revue des Maladies Respiratoires* 19: 601-615, 2002.

Sant'Ambrogio G. Role of the larynx in cough. *Pulmonary Pharmacology* 9: 379-382, 1996.

Sato K, Nakashima T. Sleep-related deglutition in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116: 747-753, 2007.

Seema Shah, Sharieff GQ. An update on the approach to apparent life threatening events. *Curr Opin Pediatr* 19: 288-294, 2007.

Silvestri JM. Indications for home apnea monitoring (or not). *Clin Perinatol* 36: 87-99, 2009.

Sitkauskiene B, Dicpinigaitis P. Effect of smoking on cough reflex sensitivity in humans. *Lung*, 2009. Epub ahead of print.

Shaker R, Hogan WJ. Normal physiology of the aerodigestive tract and its effect on the upper gut. *Am J Med* 115: 2S-9S, 2003.

Shin T, Nahm I, Maeyama T, Miyazaki J, Matsuo H, Yu Y. Morphology study of the laryngeal taste buds in the cat. *Laryngoscope* 105: 1315-1321, 1995.

Sladek M, Groggaard JB, Parker RA, Sundell HW. Prolonged hypoxemia enhances and acute hypoxemia attenuates laryngeal reflex apnea in Young lambs. *Pediatric Res* 34: 813-820., 1993.

Slotkin TA, Pinkerton KE, Seidler FJ. Perinatal environmental tobacco smoke exposure in rhesus monkeys: critical periods and regional selectivity for effects on brain cell development and lipid peroxidation. *Environ Health Perspectives* 114: 24-39, 2006.

Staines DR. Does dysregulation of key epigenetic and biochemical pathways occur in postulated vasoactive neuropeptide autoimmune disorders? *Med Hypotheses* 65:1154-60, 2005.

St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, Praud J-P. Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in non-sedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* 98: 2197-2203, 2005.

St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareilles C, Moreau-Bussiere F, Micheau P, Leblond J, Praud J-P. Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102: 1429-1438, 2007.

Stokowski LA. A primer on apnea of prematurity. *Adv Neonat Care* 5: 155-170, 2005.

Storey AT, Johnson P. Laryngeal water initiating apnea in the lambs. *Exp Neurol* 47: 42-55, 1975.

Sullivan CE, Murphy E, Kozar LF, Phillipson EA. Waking and ventilatory responses to laryngeal stimulation in sleeping dogs. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol* 45: 682-689, 1978.

Sundel HW, Karmo H, Milerad J. Impaired cardiorespiratory recovery after laryngeal stimulation in nicotine-exposed young lambs. *Pediatr Res* 53: 104-112, 2003.

Sweazey RD, Edward CA, Kapp BM. Fine structure of taste buds located on the lamb epiglottis. *Anat Rec* 238: 517-527, 1994.

Tai CF, Baraniuk JN. Upper airway neurogenic mechanisms. *Allergy Clin Immunol* 2: 11-19, 2002.

Tester DJ, Dura M, Carturan E, Reiken S, Wronska A, Marks AR, Ackerman MJ. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): Stress-induced leak via ryanodine rec. *Heart Rhythm* 4: 733-739, 2007.

Tirosh E, Libon D, Bader D. The effect of maternal smoking during pregnancy on sleep respiratory and arousal patterns in neonates. *J Perinatol* 16: 435-438, 1996.

Thach BT. Reflux associated apnea in infants; evidence for a laryngeal reflux. *Am J Med* 103: 120S-124S, 1997.

Thach BT. Sudden infant death syndrome: can gastroesophageal reflux cause sudden infant death? *Am J Med* 108 Suppl 4a: 144S-148S, 2000.

Thach BT. Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111: 69S-77S, 2001.

Thach BT. Maturation of cough and other reflexes that protect the fetal and neonatal airway. *Pulm Pharmacol Therap* 20: 365-370, 2007.

Thach BT. Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol* 104:1828-1834, 2008.

Turgeon J, Bernard-Bonin AC, Gervais P, Ovetchkine P, Gauthier M. Dictionnaire de thérapeutique pédiatrique Weber. Édition Gaetan Morin, Montréal, Canada, 2008.

Ulfig N. Précis d'Histologie. Édition Maloine, Paris, France, 2006.

Urrego F, Scuri M, Auais A, Mohtasham L, Piedimonte G. Combined effects of chronic nicotine and acute virus exposure on neutrophin expression in rat lung. *Pediatric Pulmonol* 44: 1075-1084, 2009.

Vandenplas Y, Sacre-Smiths L. Continuous 24 h esophageal pH monitoring in 285 asymptomatic infants 0-15 months old. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 220-224, 1987.

Van der Velge L, Curran AK, Filiano JJ, Darnall RA, Bartlett D, Leiter JC. Prolongation of the laryngeal chemoreflexes after inhibition of the rostral ventral medulla in piglets: a role in SIDS? *J Appl Physiol* 94: 1883-1895, 2005.

Van Norstrand DW, Ackerman MJ. Sudden infant death syndrome: do ion channels play a role? *Heart Rhythm* 6: 272-8, 2009.

Wennergren G, Hertzberg T, Milerad J, et al. Hypoxia reinforces laryngeal reflex bradycardia in infants. *Acta Paediatr Scand* 78: 11-17, 1989.

Wetmore RF. Effects of acid on the larynx of the maturing rabbit and their possible significance to the sudden infant death syndrome. *Laryngoscope* 103: 1242-1254, 1993.

Wetscher GJ, Bagchi D, Perdakis G, et al. In vitro free radical production in rat esophageal mucosa induced by nicotine. *Dig Dis Sci* 40: 853-858, 1995.

Widdicombe J. Airway receptors. *Respir Physiol* 125: 3-15, 2001.

Xia L, Crane-Godreau M, Leiter JC, Bartlett D. Gestational cigarette smoke exposure and hyperthermic enhancement of laryngeal chemoreflex in rat pups. *Respir Physiol Neurobiol* 28: 161-166, 2009.

Xia L, Damon T, Leiter JC, Bartlett D. Elevated body temperature exaggerates laryngeal chemoreflex apnea in decerebrate piglet. *Adv Exp Med Biol* 605: 249-254, 2008.

Yamamoto Y, Atoji Y, Suzuki Y. Innervation of taste buds in the canine larynx as revealed by immunohistochemistry for the various neurochemical markers. *Tissus cell* 29: 339-346, 1997.

Yoshida T, Matsuda H, Yamamoto Y, Hayashida Y, Tsukuda M, Kusakabe T. Chronic hypoxia alters calbindin D-28k immunoreactivity in lingual and laryngeal taste buds in the rat. *Histol Histopathol* 2: 1271-6, 2006.

Yoshida Y, Tanaka Y, Hirano M, Nakashima T. Sensory innervation of the pharynx and larynx. *Am J Med* 108: 51S-61S, 2000.